

**TESIS DOCTORAL**

**CORRELACIÓN Y VALIDACIÓN DE  
CRITERIOS DIAGNÓSTICOS  
Y  
ESCALA DE SEVERIDAD  
EN LA INSUFICIENCIA LIMBAR  
ASISTIDA CON  
MICROSCOPIA CONFOCAL**



DOCTORANDO:  
Manuel Caro Magdaleno

DIRECTOR:  
Dr. D. Jesús Montero Iruzubieta

CODIRECTORES:  
Dr.D. Enrique Rodríguez de la Rúa Franch  
Dr. D. Eduardo Esteban González

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA  
SEVILLA, 2015





*“Las cosas bien hechas, Dios las bendice”*  
Antonio Caro Silva

*A mi “Yaya”, por toda su sapiencia e ilusión, espero que te sientas orgulloso de mi,  
estés donde estés. Q.e.p.d.*

## **AGRADECIMIENTOS**

El orden de los factores no altera el producto, eso me decían en la escuela de la que nunca saldré.

Dicho ésto, no puedo más que empezar por los que estructuraron con amor y sudor mi “corazón”, mis valores y mi propia alma, como son **mis queridos Padres** -en mayúsculas- y a las dueñas de él, mis dos niñas, mi mujer, **Anabel y mi hija Daniela**. A “ellas” les debo disculpas por tanto tiempo robado, que no perdido, y que han soportado estoicamente con paciencia.

Esta tesis, me ha servido, para cosas tan importantes como para marcarme la senda que quiero recorrer en mi vida profesional, ya que mi amor por la córnea, la superficie ocular y la investigación, tras este esfuerzo ha sido el acicate que faltaba. Además, ha ordenado esta “cabecita mía” en el bonito y difícil arte de investigar, en la medida de mis capacidades para empezar a dar mis primeros pasos de lo que espero, sea un largo camino, ya que tengo lo que más hace falta, pasión por ellas.

A **Jesús Montero** le debo tanto que no sé si sabré explicarlo. La primera cosa que le debo y al hilo de lo comentado anteriormente, es que me ha inculcado ese amor que tiene él por la córnea y aunque mi empeño ya era grande, lo ha “hipertrofiado”. Cuando le dije que si me ayudaba con la tesis no sabía realmente como era, tampoco lo conocía tanto. Es de esas personas que saben como eres a los tres minutos de hablar contigo, que saben exprimerte para que lo des todo y si ven entrega también lo entregan todo. Me ha abierto, literalmente las puertas de su casa, nunca ha dejado de trabajar a mi lado y cuando en varios momentos el cielo se puso oscuro sobre la tesis supo encender un faro, siempre con un pragmatismo que me dejaba boquiabierto. ¡Ay, el primer día que pude localizar, ver y

fotografiar una cripta limbar! Casi se me saltan las lágrimas. Una cosa que me sorprendió sobremanera, es que a pesar de ese “nervio” que le caracteriza, inquietud en estado puro, ha sido capaz de escucharme día tras día, las miles de dudas que me surgían, con entrega y paciencia a pesar de que eran las ocho y media de la tarde y se había pegado todo el día currando al cien por ciento. En esta tesis no he perdido nada como dije, pero si he ganado mucho, y lo más importante, un amigo y un maestro. Gracias por todo eso y más.

A **Enrique Rodríguez de la Rúa**, le debo el entusiasmo que le imprime a las personas, te hace creer que eres capaz de todo, te ilusiona, “te pone en el candelerero” y esa es una virtud insólita y generosa. Lo peor de todo, es que cree en ti de verdad y te pone en el aprieto de darlo todo para no defraudarlo. El apoyo que he sentido es inconmensurable, y como un tutor a un naranjo, me iba dirigiendo para que “no me diluyera”. Muchas gracias, Enrique.

A Eduardo, le debo la alegría y ser un luchador, además de un buen “sevillista” de pro. Generoso como ninguno, “gadita” bueno, que lleva la bandera del buen humor y la concordia como lema.

La verdad es que he tenido tanta suerte con mis directores que no me la merezco.

A **Ana Fernández**, mi estadística de cabecera, porque es una madre incluso para los que no somos sus hijos, es cariñosa, generosa y cumplidora a la par. Nunca te falla. A ella le debo parte de este trabajo.

A **Ignacio Montero y Rafael Márquez** le debo la ilusión por seguir los pasos hasta terminar la tesis y llenarme de ilusión por hacerla, que no es poco.

**Ignacio** me ha guiado desde que era residente por el mundo oftalmológico, y con acierto. Aunque se que su ayuda es totalmente desinteresada, tengo claro que será una ayuda que jamás podré devolver. Gracias Ignacio por estar siempre ahí.

A **Asun**, por su gran ayuda, colaboración y facilitarme las cosas, incluso cuando estaba “muy embarazada”. A **Manu Castillo** por su esfuerzo.

A mis compañeros y amigos por apoyarme, darme ánimos, facilitarme la ardua tarea, en especial, **Ana Muñoz, Beatriz Mataix y Juan Ramón del Trigo**. Ana, mi residente mayor, la persona más pragmática y lista que conocí, una suerte de amiga, que me ha animado, ayudado, *sine die*. Juan Ramón un maestro de los que extraje y seguiré haciéndolo, sabios consejos en mi vida profesional, buena persona sin igual y aunque sea un poco “verderón”, se lo perdono. Beatriz, una gran compañera, que siempre que la llamé ahí estuvo, animándome, fiel compañera de “fatiguitas”.

Para mis compañeros de la **Unidad de Superficie Ocular de Sevilla(USOS)**, mil gracias por vuestros ánimos. Se abre un mundo de posibilidades y de retos en este tiempo, en el cual mejorar nuestros conocimientos y nuestras prácticas en pro de nuestros pacientes, esos que nos rondan la cabeza intempestivamente, en la continua búsqueda de la excelencia corneal. No se me ocurre nada mejor que hacerlo con vosotros, compañeros y amigos.

A mi querido **equipo de Cartujavisión, Ángela, Eli, Candela y Lola**, me habéis facilitado tanto el trabajo que casi ni me daba cuenta que estaba encerrado contando células en pleno agosto. Sois cariñosas y eficientes a la par. Cada vez que llego sólo hay sonrisas y abrazos, así da gusto

Al **Ingeniero Carlos Rueda**, amigo mío, que en un momento de atasco “vital” con la tesis, me hizo la luz con su esfuerzo y sacrificio, prestando su mano cuando más lo necesité.

A mi administrativa de cabecera que de forma desinteresada me ha ayudado a localizar a tantos pacientes y tantas citas, **Pilarcita**.

Al equipo de San Lázaro que son las mejores, **Julia, Joaqui, Loli y Pilar**, que haría yo sin vosotras, mis manos y mis pies. Gracias.

A **mis queridos residentes** que tanto me han apoyado y animado. Por su ayuda en esta tesis a Consu, Agua, Ainhoa, Sybe, Rafa, Ana y Belén. Tengo que dar un especial agradecimiento por su ayuda a **Consu**, siempre de buen ánimo y además, agradecer sus magníficas ilustraciones.

A **Manolo Ales**, por su desinteresada ayuda en la edición de esta tesis y su prestancia sin igual, un amigo que he ganado. ¡Viva la Pastora!

A mis jefes, **Beatriz Ponte y Enrique**, por apoyarme y ayudarme en tantas gestiones que sin ellas hubiera sido imposible culminar varios puntos de esta tesis.

De mis maestros del Hospital Virgen del Rocío, **Javier Arriaga, Juan Ramón del Trigo, Trini Rueda, Antonio Medina, Emilia García Robles, Aurora del Estad, Amparo Toro, Fernanda Aranda, Rafa Luchena, Norberto Seva, y tantos otros**, debo parte del amor que siento por mi profesión y el empeño en mejorar día tras día.

A **mis compañeros del Macarena**, por mi aprendizaje real “en campo abierto” en esta bonita profesión, por su ayuda, su buen hacer y su ánimo para realizar esta tesis.

A **mis amigos**, por compartir tan grandes momentos y ser un buen hombro donde apoyarse. En especial, a **Salva** por darme ideas tan buenas y ayudarme en esta tesis. Un “Grande” de la medicina.



# **ÍNDICE**

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>13</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>16</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS....</b>	<b>127</b>
<b>III. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>132</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>159</b>
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>185</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>218</b>
<b>VII. PUBLICACIONES .....</b>	<b>221</b>
<b>VIII. INVESTIGACIONES FUTURAS .....</b>	<b>223</b>
<b>IX. PLAN DE DIFUSIÓN .....</b>	<b>225</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>227</b>
<b>XI. ANEXOS .....</b>	<b>247</b>



## ABREVIATURAS

ACC: afectación de la córnea central

BEA: brillo epitelial apagado

CAT: células amplificadoras transitorias

CIN: neoplasia conjuntival intraepitelial

CK: citoqueratina

CML: células madre limbares

CPM: células postmitóticas suprabasales

DE: desviación estándar o típica.

DVH: donante vivo histocompatible

FSPs: *focal stromal projections*

HRT: *Heidelberg Retina Tomograph*

IL: insuficiencia Limbar

IVCM: *in vivo confocal microscopy* (Microscopía Confocal In Vivo)

K5M: Keratograph 5M (Oculus, Wetzlar, Alemania)

LCs: *limbal crypts*

LEC: *limbal epithelial crypts*

LSCD: *limbal stem cell deficiency*

MA: membrana amniótica

MSC: células mesenquimales

NIBUT: *No Invasive Break-Up Time*

NIK BUT: *Non Invasive Keratograph Break-Up Time*

ORI: *Ocular Redness Index*

PAS: Ácido Peryódico-Schiff

RMS: *Root Mean Square*

SO: superficie ocular

SSCE: *Sequential Sectoral Conjunctival Epitheliectomy*

TBUT: *Tear Break-Up Time*

TMA: trasplante membrana amniótica

TMH: *Tear Meniscum Height*

TTP: tinción tardía y persistente

VBR: *Validated Bulbar Redness*

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Foto de una queratopatía columnar tras autotrasplante limbar.....	24
Figura 2.- Limbo esclerocorneal e hipótesis de Thoft.....	32
Figura 3.- Epitelio corneal y plexo nervioso subasal.....	34
Figura 4.- Citología de impresión de muestra corneal.....	44
Figura 5.-Patente 3013467 del microscopio confocal. Minsky 1961.....	49
Figura 6.- Microscopio confocal <i>laser-scanning</i> HRT III con módulo de córnea Rostock.....	52
Figura 7.-Criptas limbares y empalizadas de Vogt.....	56
Figura 8.- Microscopía confocal del epitelio corneal y limbar.....	58
Figura 9.- Mapa de inervación corneal según los últimos hallazgos con microscopía confocal.....	62
Figura 10.- Ilustración del funcionamiento de una cámara de Scheimpflug.....	75
Figura 11.- Esfericidad y asfericidad.....	78
Figura 12.- Keratograph 5M.....	81
Figura 13.- Keratograph 5M: diferentes luces tipo LED y sus aplicaciones.....	88
Figura 14.- Algoritmo del tratamiento quirúrgico de la insuficiencia limbar.....	102
Figura 15.- Descripción de la técnica quirúrgica de autotrasplante limbar.....	105

Figura 16.- Descripción de varias técnicas quirúrgicas de alotrasplante limbar de cadáver.....	110
Figura 17.- Diversas etapas del cultivo ex vivo de células limbares.....	114
Figura 18.- Células cultivadas de morfología epitelial.....	115
Figura 19.- Cultivo sobre membrana amniótica denudada.....	116
Figura 20.- Osmolarímetro TearLab.....	140
Figura 21.-Microscopio confocal HRT II con módulo de córnea Rostock.....	142
Figura 22.- Material necesario para realizar microscopía confocal.....	143
Figura 23.- Gráfico de sectores sobre la etiología de la IL en nuestra muestra.....	161
Figura 24.- Gráfico de Bland-Atlman de la relación entre OSDI tradicional autocumplimentado y OSDI del keratograph 5M.....	175
Figura 25.- Gráfico de Bland-Atlman de la relación entre NIKBUT y TBUT.....	177
Figura 26.- Altura del menisco lagrimal según la clasificación confocal de Deng...	180
Figura 27.- Enrojecimiento limbar temporal y nasal según la clasificación confocal de Deng.....	181
Figura 28.- NIKBUT primero y medio según la clasificación confocal de Deng....	181
Figura 29.- OSDI K5M según la clasificación confocal de Deng.....	182
Figura 30.- Grados de pérdida de glándulas de Meibomio según la clasificación confocal de Deng.....	182
Figura 31.- Osmolaridad según la clasificación confocal de Deng.....	183



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Densidad celular del epitelio corneal en personas sanas.....	53
Tabla 2.-Densidad celular del epitelio corneal y nervios del plexo subasal en pacientes con IL.....	54
Tabla 3.- Densidad de nervios del plexo subasal en sanos.....	54
Tabla 4.- Valores de Q (asfericidad).....	78
Tabla 5.- Causas de insuficiencia del limbo y su frecuencia relativa.....	90
Tabla 6.- Estadiaje preoperatorio de Schwartz-Holland.....	90
Tabla 7.- Clasificación de la insuficiencia de limbo.....	92
Tabla 8.- Clasificación de los procedimientos quirúrgicos para la rehabilitación de la superficie ocular (“Cornea Society”).....	99
Tabla 9.- Clasificación de los procedimientos quirúrgicos para la rehabilitación de la superficie ocular basados en ingeniería titular (“Cornea Society”).....	100
Tabla 10.- Criterios de subdivisión de pannus para analizar el comportamiento de las variables estudiadas.....	150
Tabla 11.- Valores de referencia del índice de concordancia Kappa y el coeficiente de correlación intraclase.....	152
Tabla 12.-Causas de insuficiencia de limbo en nuestro estudio expresadas en porcentajes.....	161
Tabla 13.- Descriptiva general de nuestra muestra.....	163

Tabla 14.- Resultados de la encuesta de VFQ 25 y OSDI autocumplimentado en nuestra muestra.....	162
Tabla 15.- Porcentaje de pacientes en cada estadio según las diferentes clasificaciones....	164
Tabla 16.- Densidad de nervios del plexo subasal, densidad celular corneal y otras variables de interés con su significación estadística(p) entre grupos divididos según diferentes estadios de avance del pannus.....	166
Tabla 17.- Variables con diferencia estadísticamente significativa entre grupos divididos según diferentes estadios de avance del pannus.....	167
Tabla 18.- Índice Kappa de concordancia entre las distintas clasificaciones basadas en signos y síntomas con respecto a la clasificación confocal de Deng.....	169
Tabla 19.- Comparativa de medias de densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal de los pacientes con IL de nuestra muestra con respecto a valores de referencia de personas sanas y nuestros controles.....	171
Tabla 20.- Comparativa de medias de densidades celulares de nuestra muestra de los casos de IL con los datos de referencia en sanos y nuestros controles.....	171
Tabla 21.- Clasificación confocal de Deng modificada.....	173
Tabla 22.- Variables con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con(grupo A) /sin(grupo B) visualización del plexo nervioso.....	174





# **I. INTRODUCCIÓN**

## **I.1. DEFINICIONES, HALLAZGOS HISTÓRICOS Y ANATOMÍA DEL LIMBO ESCLEROCORNEAL Y LAS CÉLULAS MADRE LIMBARES**

## **I.2. HISTOLOGÍA Y MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS DEL LIMBO ESCLEROCORNEAL**

## **I.3. SÍNTOMAS Y SIGNOS CLÍNICOS DE LA INSUFICIENCIA LIMBAR**

## **I.4. CRITERIOS Y PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LA INSUFICIENCIA LIMBAR**

### **I.4.1. BIOPSIA EXCISIONAL**

### **I.4.2. CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN**

### **I.4.3. RT-PCR MUC5AC (LIMBOKIT®)**

## **I.5. MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO* (IVCM)**

### **I.5.1. INTRODUCCIÓN E HISTORIA**

### **I.5.2. COMPONENTES DE UN MICROSCOPIO CONFOCAL**

### **I.5.3. TIPOS DE MICROSCOPIOS CONFOCALES**

### **I.5.4. MANEJO DEL HRT-II CON EL MÓDULO DE CórNEA ROSTOCK**

### **I.5.5. APLICABILIDAD**

### **I.5.6. LA SUPERFICIE CORNEAL VISTA DESDE UN MICROSCOPIO CONFOCAL**

### **I.5.7. NERVIOS CORNEALES:UN NUEVO MUNDO POR DESCUBRIR.**

### **I.5.8. TECNOLOGÍA *3D CONFOCAL MICROSCOPY THROUGH-FOCUSING* (CMTF)**

### **I.5.9. OTRAS APLICACIONES EN OFTALMOLOGÍA**

### **I.5.10. USOS NO OFTALMOLÓGICOS DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL**

## **I.6. PENTACAM**

### **I.6.1. APLICACIÓN DEL PENTACAM® EN PATOLOGÍA CORNEAL**

## **I.7. KERATOGRAPH 5M**

## **I.8. CLASIFICACIONES DE LA INSUFICIENCIA DE LIMBO**

## **I.9. TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA DE LIMBO**

### **I.9.1. TRATAMIENTO MÉDICO Y CONSIDERACIONES PREVIAS AL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO**

**I.9.1.1. PRINCIPIOS GENERALES**

**I.9.1.2. SUERO AUTÓLOGO**

**I.9.1.3. MEMBRANA AMNIÓTICA**

**I.9.2. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO**

**I.9.2.1. HISTORIA DEL TRASPLANTE LIMBAR**

**I.9.2.2. ESQUEMA GENERAL DEL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO**

**I.9.2.3. EPITELIECTOMÍA SECTORIAL CONJUNTIVAL SECUENCIAL**

**I.9.2.4. AUTOTRASPLANTE LIMBAR Y TRASPLANTE LIMBAR DE DONANTE VIVO HISTOCOMPATIBLE**

**I.9.2.5. ALOTRASPLANTE LIMBAR DE DONANTE CADÁVER**

**I.9.3. CULTIVO CELULAR EX VIVO PARA TRASPLANTE EN INSUFICIENCIA DE LIMBO**

**I.9.3.1. CULTIVO EX VIVO DE CÉLULAS LIMBARES**

**I.9.3.2. CULTIVO EX VIVO DE CÉLULAS EPITELIALES DE LA MUCOSA ORAL AUTÓLOGA**

**I.9.3.3. CULTIVO EX VIVO DE CÉLULAS CONJUNTIVALES AUTÓLOGAS**

**I.9.3.4. CULTIVO EX VIVO DE CÉLULAS MESENQUIMALES**

**I.10. SITUACIÓN ACTUAL**

## **I.1. DEFINICIONES, HALLAZGOS HISTÓRICOS Y ANATOMÍA DEL LIMBO ESCLEROCORNEAL Y LAS CÉLULAS MADRE LIMBARES**

La Insuficiencia limbar (IL), o su término en inglés, *limbal stem cell deficiency* (LSCD), ha sido definida como la incapacidad de las células madre limbares de mantener la integridad del epitelio corneal(1). Esto puede ocurrir por:

- Microambiente estromal insuficiente para mantener la homeostasis de dichas células que lleva a la disfunción y destrucción progresiva de estas células.
- Ausencia de nicho donde se alojen, nutran y protejan las células madre limbares de agentes mecánicos, radiaciones, etc. Esto ocurre v.g., en la aniridia.
- Factores externos que destruyan las células madre de forma parcial o total: agresiones químicas o térmicas, radiaciones ultravioletas o ionizantes, enfermedades mucosinequiantes, cirugías, crioterapia, fármacos, lentes de contacto o infecciones, entre otros.

La Insuficiencia se denomina a veces como “limbar” y otras, como “límbica”. De igual manera, este adjetivo hace mención sólo a la localización, que no es sino el limbo esclerocorneal. Tras consultar con la Real Academia Española, contestan que se puede denominar de igual forma con estos dos adjetivos. Al respecto de este tema la RAE refiere y con ello introducimos sus definiciones:

“En relación con su consulta, le remitimos la siguiente información:

Se trata de voces técnicas, del ámbito de la anatomía. El *DRAE* solo recoge las más usuales, pues se considera que han pasado al léxico general de los hablantes. Sí las trae el *Diccionario de términos médicos* de la Real Academia Nacional de Medicina:

**limbo esclerocorneal** [ingl. corneoscleral junction]

1 [TA: *limbus corneae*] Zona circular de superposición entre la córnea y la esclerótica y, también, entre la córnea y la conjuntiva ocular, definida sobre la superficie del globo ocular por el surco esclerocorneal.

**SIN.:** limbo corneal, limbo corneoescleral.

**OBS.:** Con frecuencia abreviado a "limbo".

**limbar** [ingl. *limbic*]

1 adj. Del limbo esclerocorneal o relacionado con él.

**SIN.:** límbico.

**límbico, -ca**

1 adj. = limbar.

2 [ingl. *limbic*] adj. Del sistema límbico o relacionado con él."

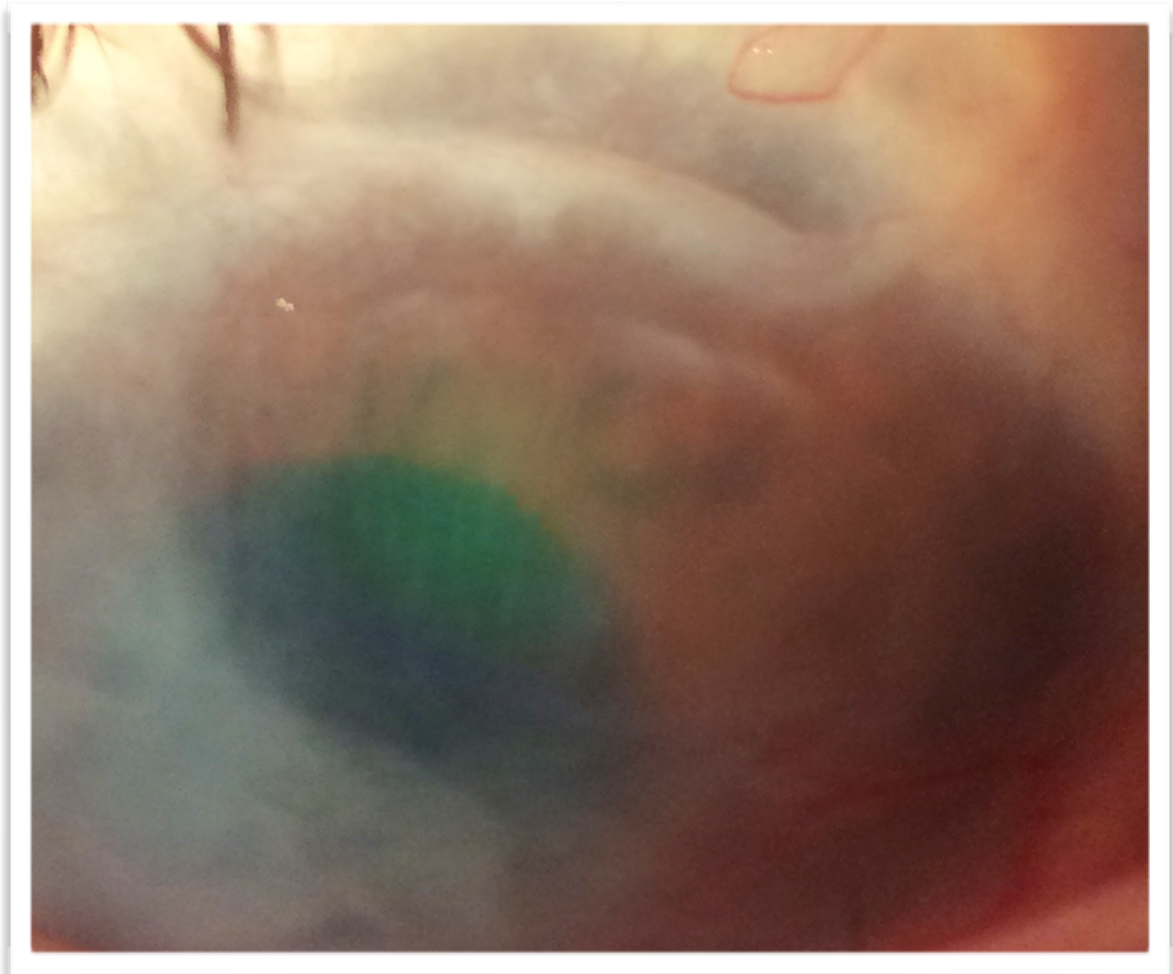
Estas células troncales, madre, primordiales o germinales derivan del término anglosajón "Stem Cell"(SC). El término "stem" proviene de la botánica, denominando con este nombre a las células localizadas en el inicio de los brotes de las plantas(2). Las *stem cell* se definen como células indiferenciadas o poco diferenciadas que tienen la capacidad de autorregenerarse y diferenciarse en uno o más tipos celulares ("stemness"). La primera evidencia científica de la existencia de las *stem cell* se encontró en las células madre hematopoyéticas de la médula ósea de los ratones en 1960. En MeSH (Medical Subject Headings) se introdujo el término de "células madre hematopoyéticas" en 1972 y el de "*stem cell*" en 1984(3). Aun hoy, "*limbal stem cell deficiency*" no aparece en MeSH.

Se pueden extraer *stem cells* hematopoyéticas y mesenquimales del cordón umbilical y de la placenta con métodos no invasivos, libres de consideraciones éticas relacionadas con la obtención de tejidos embrionarios y de fácil obtención. De estas células se pueden obtener osteoblastos, condroblastos, adipoplastos, precursores de músculo esquelético y neurales con baja capacidad antigénica y menor posibilidad de rechazo. Las *stem cells* embrionarias expresan bajos niveles de antígenos de histocompatibilidad MHC clase I y generalmente no expresan los de clase II (3). Existe la posibilidad de rechazo por proteínas relacionadas con las mitocondrias, pero el número de éstas son relativamente bajos como para producir una respuesta inmunológica importante.

El limbo esclerocorneal es una estructura que se sitúa entre la córnea transparente y la esclera blanca siendo una transición y a la vez, barrera física, entre dos epitelios con características bioquímicas y fenotípicas diferentes (4). Algunos la delimitan anteriormente en el final de la capa de Bowman (5). Éste mide aproximadamente unos dos milímetros de ancho aproximadamente y en él se disponen unas crestas dispuestas de forma radial al centro corneal por donde discurren vasos sanguíneos, fibras nerviosas y a las que se denominan *empalizadas de Vogt* (6)(**figura 1**).

Las empalizadas de Vogt fueron descritas por primera vez por Manz en cerdos en 1859 y postuló que tenían una función glandular (7, 8). Más tarde fueron denominadas “radial stripes” en 1914 por Streiff, “radial pseudocysts” por Koepppe en 1917, “palisades” por Vogt en 1921 y “trabeculae” por Graves en 1934(7, 8). Fue el nombre acuñado por Vogt el que perduró hasta nuestros días (6). Aurell y Kornerup en 1949, las consideraron glándulas lagrimales accesorias (9). Sin embargo, años después, en 1958, Sir Stewart Duke-Elder describió que las empalizadas de Vogt eran en el hombre, vestigios de las glándulas descritas por Manz en cerdos, y sin función alguna (7). Davanger et al., en 1971 describen la

verdadera función de estas estructuras en su artículo “Role of Pericorneal Papillary Structure in Renewal of Corneal Epithelium”(7).



**FIGURA 1. FOTO DE UNA QUERATOPATÍA COLUMNAR TRAS AUTOTRASPLANTE LIMBAR.**

Las empalizadas de Vogt son unos enclaves privilegiados de nutrientes, protección y neurotrofismo. Entre éstas, como describía Shortt, “encerradas entre las empalizadas de Vogt”, se encuentran las criptas limbares y en la zona basal de éstas están las células madre limbares (10). De hecho según diferentes autores se han descrito con diferentes términos y localizaciones *limbal epithelial crypts* (LEC, por Dua en 2005) (11), *limbal crypts* (LCs, por Shortt en 2007) y *focal stromal projections* (FSPs, por Shortt en 2007) (5). Las empalizadas de Vogt se ven como hiperpigmentaciones lineales de forma radial de 1 mm de longitud en el limbo esclerocorneal. Las empalizadas de Vogt se visualizan mejor en la zona superior e

inferior limbar y es, en dichas zonas, donde hay mayor concentración de células limbares (12). De hecho, Shortt et al. demostraron que las las LCs y FSPs se encuentran mayoritariamente en la zona superior e inferior limbar, extendiéndose de forma variable hacia temporal y nasal, estando ausentes en el meridiano horizontal. No obstante, en el 20% de los pacientes no se pueden identificar en lámpara de hendidura las empalizadas de Vogt (13).

Hasta que no surgió el concepto de célula madre no se empezó a relacionar la localización de estas células madre del epitelio corneal con las criptas limbares que estaban en el limbo esclerocorneal. Dicha localización se postuló por primera vez por Schermer en 1986 debido a que las células que encontró en dicha zona no expresaban una proteína de 64 kiloDalton (KDa) que si expresaban otras células epiteliales corneales(14). Posteriormente en 1989, el dermatólogo George Cotsarelis y colaboradores, describieron que estas células tenían un ciclo largo mediante timidina tritiada, características propias de células madre(15). Anteriormente a estos autores se habían encontrado hallazgos en similar dirección por Potten, Hanna y Davanger (7, 16-19). En conejos si se ha podido demostrar la localización de las células madre limbares en el limbo esclerocorneal (20), aunque en humanos esto aún no se ha podido confirmar.

No obstante lo anterior, tanto Dua (21) como Shortt(5) han descrito numerosos hallazgos clínicos y científicos que evidencian dicha localización. No sólo eso, sino que ambos autores proponen un lugar donde residen dichas células madre limbares dentro del limbo y muestran varias evidencias al respecto.

Dua y colaboradores en 2005, describen las *limbal epithelial crypts* (LEC) como localización de dichas células madre limbares y aunque descubre marcadores propios de las células madre en esta localización como el *ATP-Binding cassette G2*(ABCG2), no aportó

pruebas definitivas de que las células halladas en las LCE fueras las *stem cell* corneales. Normalmente existen de cinco a siete LCE por córnea, dispuestas en la parte periférica de las crestas epiteliales que existen entre cada empalizada de Vogt (11).

Estos marcadores o identificadores, como el ABCG2, ¿por qué son tan importantes? Pues, por la posibilidad de aislar, identificar y reprogramar *stem cell* adultas, y así, inducir *stem cell* pluripotentes abriendo un campo amplio en la reparación y regeneración tisular. Para ello, es crítico identificar de forma inequívoca dichas *stem cell*. Entre los marcadores propuestos están genes, proteínas nucleares (p63), receptores de membrana (factor de crecimiento epidérmico, CD71), proteínas de membrana celular (CD34, Cd133, CD117), citoquinas (integrina  $\beta 1$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 9$ , CCR4), transportadores de resistencia a drogas (ABCG2/BCRP), proteínas citoplasmáticas (nestina, vimentina, citoqueratinas[CK]),...

Tal y como describimos, Dua y colaboradores, enumeraron diferentes evidencias clínicas y científicas que indican la existencia de las células madre de la córnea y que están en el limbo esclerocorneal (21). Desde el punto de vista de la clínica, se observa que la restauración del epitelio corneal va de forma centripeta desde el limbo al centro corneal(22). De hecho, se observó que en conejos en los que se les había desepitelizado la córnea, analizando su velocidad de reepitelización, las desepitelizaciones corneales grandes cerca del limbo reepitelizaban más rápido que otras pequeñas no tan cerca del limbo(23). Además Dua describió que en abrasiones en humanos donde se afecta el limbo, siempre se reepiteliza el limbo de forma circunferencial y luego de forma centripeta hacia el centro de la córnea(24). Por otro lado, si se realizan repetidas desepitelizaciones corneales centrales, la tasa de curación de la segunda vez es más rápida que la primera(25). Incluso se ha descrito la queratopatía columnar, en la que la patología limbar se manifiesta con unas columnas de células que tiñen alternando con otras que no, desde limbo al centro corneal(26)(**figura 1**).



Entre las evidencias científicas que se han observado, están la alta tasa de mitosis y proliferación de las células limbares, siendo la más alta de la córnea(27), incluso in vitro(28). Además, las células limbares basales no tienen marcadores de diferenciación como la citoquina Ck3 (14). Histológicamente las células basales limbares tienen núcleos grandes y son más pequeñas que las células diferenciadas conjuntivales y corneales, relacionado este hallazgo con su indiferenciación y siendo de similares características a las observadas en otras células madres. Por otro lado, tienen una tasa aumentada de hemidesmosomas en la capa basal y ausencia de “gap junctions”, otro rasgo más de las *stem cell*.

Numerosas moléculas han sido descritas en estas células madres limbares en relación a su condición de *stem cells*, v.g., la presencia de alfaenolasa(29), el receptor EGF(30), vimentina(31), y CK19(32), o la ausencia de otras, como CK3/12, conexina CX43(33). Curiosamente, la citoqueratina CK19 se expresa en fetos tanto en córnea como en limbo, pero en adulto sólo en limbo(34). Actualmente los marcadores más reconocidos y usados en cultivos son el p63 y el ABCG2(1). El factor de transcripción p63 ha sido descrito como marcador de estas células madre limbares. Existen 6 isoformas del p63, encontrándose en los queratinocitos oculares diferentes formas de la isoforma  $\Delta Np63$ . La más abundante es la isoforma  $\Delta Np63\alpha$ , siendo exclusiva del limbo y no encontrándose en la córnea(35). Además se cree involucrada en el control de la expresión de la integrina  $1\beta$ , que también es marcador del mismo tipo de población en la epidermis humana(36). La proteína transportadora ABCG2 se encuentra en la membrana celular y citoplasma de la mayoría de células basales de limbo pero no en las de la córnea(37).

Shortt et al., en 2007, aseveraron tener pruebas de que las células madre limbares están en el limbo esclerocorneal(5). Describió como las células madre limbares se

encontraban en la capa basal de dos estructuras que delimitó en el limbo esclerocorneal entre las empalizadas de Vogt y rodeadas por una red vascular suplementaria. Dichas estructuras son las *limbal crypts* (LCs) y *focal stromal projections* (FSPs), estructuras distintas de las descritas por Dua en 2005(11), según Shortt. La primera evidencia según este autor, sería que los marcadores ABCG2 y p63 $\alpha$  aparecen en mayor número de células en las zonas que hay LCs y FSPs con respecto a zonas donde no aparecen dichas estructuras(5). En segundo lugar, las células de esta zona son de tamaño celular pequeño y con ratio nucleocitoplasma aumentado, propio de las *stem cell*(38-41). En tercer lugar, las biopsias que hicieron en zonas ricas en LCs y FSPs, guiadas por microscopía confocal (IVCM), producían mayor rendimiento en los cultivos *ex vivo*, que si se realizaban en zonas con densidad menor de dichas estructuras. Por último, las personas con función epitelial corneal normal presentan dichas estructuras, sin embargo en los pacientes con IL son indetectables(5).

Por el contrario hay que reseñar que existen evidencias de células con características inmunofenotípicas similares a las células madre limbares en córnea periférica y en la conjuntiva perilimbar(42), siendo estas características muy frecuentes en las células epiteliales de toda la córnea en los niños. Con la edad disminuyen y se localizan mayoritariamente en las criptas limbares(43).

Por otro lado, en 2011 Zarei-Ghanavati, del grupo de Deng, describieron una nueva estructura en el limbo. Le denominaron "*limbal lacuna*". Estas estructuras las encontraron en 4 ojos de pacientes sanos y en pacientes con IL parcial en la zona de limbo sana. Dichas estructuras están llenas de células limbares epiteliales compactas de aspecto normal, bordes nítidos, citoplasma hiporeflexivo y núcleo no visible, localizadas en la zona posterior del limbo. Las empalizadas de Vogt por el contrario son cordones hiperreflexivos de aspecto

similar a la capa de Bowman. Es un hecho comprobado que las empalizadas de Vogt se van atrofiando hacia la senectud, y en muchos casos desapareciendo sin que eso signifique una IL(44). Pues bien, estos autores proponen esta estructura como alternativa al nicho limbar descrito hasta ahora. Las *limbal lacuna* se ven en personas mayores debido a que las empalizadas de Vogt se atrofian dejando ver a aquellas(45).

Como hemos mencionado, antiguamente se postulaban las empalizadas de Vogt<sup>1</sup> como el *nicho* de las células madre limbares(7). Este término, *nicho*, fue descrito por primera vez por Mills en 2001(46) cuando comentaba un artículo de Bjerknes y Cheng que en ese mismo año describían un nuevo concepto de interacción entre la neuronas entéricas y la diferente replicación de dos linajes celulares en las criptas intestinales de Lieberkühn según la influencia de factores segregados por dichas neuronas(47). A esta “influencia” se le denominó *microambiente*. Las evidencias científicas indican que el *microambiente* que rodea las células madre marca sobremanera, sus funciones y estados de replicación.

El *nicho* da protección y nutrición a las *stem cell*(48). De hecho, Dua en 2005 y Shortt en 2007, situaron dicho nicho en las criptas limbares(5, 11), entre las empalizadas de Vogt, lo cual le confiere protección mecánica mediante un estroma rico en colágeno tipo IV, muy elástico. Al igual, dicha localización tiene una vascularización rica proporcionada por el plexo capilar resultado de la anastomosis de la circulación superficial conjuntival y de otra más profunda proporcionada por la circulación ciliar. Esta última vascularización justifica la reacción ciliar producida cuando hay inflamación intraocular. Por otra parte, en esta zona existen mayor número de melanocitos que proporcionan protección a la radiación ultravioleta, ya que estas células son más sensibles a las radiaciones. La alta capacidad de proliferación que tienen las células madre limbares las hace susceptibles al efecto

---

<sup>1</sup> Aun no se conocían que realmente estaban dentro de otras estructuras flanqueadas por las empalizadas de Vogt.

mutagénico de las radiaciones ultravioletas. Esto se ve sustentado por la frecuencia de las neoplasias intraepiteliales localizadas en esta zona y las mutaciones observadas en los pterigium que hacen que se expresen proteínas de membrana que no existen en el epitelio corneal normal(49).

No hay que olvidar que dichas células son las encargadas de mantener la superficie ocular, y en concreto el epitelio corneal. Ésta es la primera zona de contacto de nuestro ojo con el resto del medio, es nuestra defensa y ventana hacia él, por lo que debe estar y está en constante renovación. Una capa lagrimal adecuada y estable, un epitelio liso, estanco y con alta capacidad de renovación, un estroma con una alineación homogénea de sus fibras de colágeno y un endotelio funcional, son requisitos corneales necesarios para una visión nítida.

La vía normal de reparación tisular en nuestro organismo es mediante la extravasación vascular de determinados elementos implicados en la cicatrización. Sin embargo, la córnea es avascular por lo que su mecanismo de reparación y, por ende, de renovación constante es distinto, siendo los componentes principales de dicho mecanismo las células madre limbares.

## **I.2. HISTOLOGÍA Y MARCADORES**

### **INMUNOHISTOQUÍMICOS DEL LIMBO**

### **ESCLEROCORNEAL**

La superficie ocular está recubierta por epitelio estratificado, escamoso y no queratinizado. Proviene del ectodermo y según la región, se divide en corneal, limbar o conjuntival, con características fenotípicas y funcionales diferentes.

Las células madre responsables de la renovación del epitelio corneal se encuentran, muy probablemente, en el limbo esclerocorneal y las de la conjuntiva repartidas por toda la superficie conjuntival (21)(**figura 2**).

El epitelio corneal está constituido por epitelio escamoso estratificado no queratinizado de unas 50 micras de grosor formado por 5 capas a nivel central y aproximadamente 10 a nivel periférico formando una barrera eficaz contra patógenos y agresiones externas. Existen tres tipos de células en el epitelio corneal. De posterior a anterior sería la capa de células basales, la capa de células alares y la capa de células superficiales. Todas las capas del epitelio corneal tienen hemidesmosomas o *zónula adherens* y desmosomas. Sin embargo, sólo las células basales y las alares disponen de unas uniones que son canales que permiten el paso de pequeñas moléculas, las “*Gap junctions*”. La capa de células superficiales dispone además de unas uniones extremadamente fuertes llamadas “*tight junctional complexes*” o *zónula occludens* que evitan el paso de la lágrima al espacio intercelular que impediría la necesaria transparencia corneal. La capa de células basales es una monocapa de células columnares, con citoplasma extenso, mitocondrias y aparato de Golgi prominentes. Éstas son las únicas del epitelio corneal con capacidad mitótica(50). La capa de células alares son 2-3 capas de células fusiformes con escaso

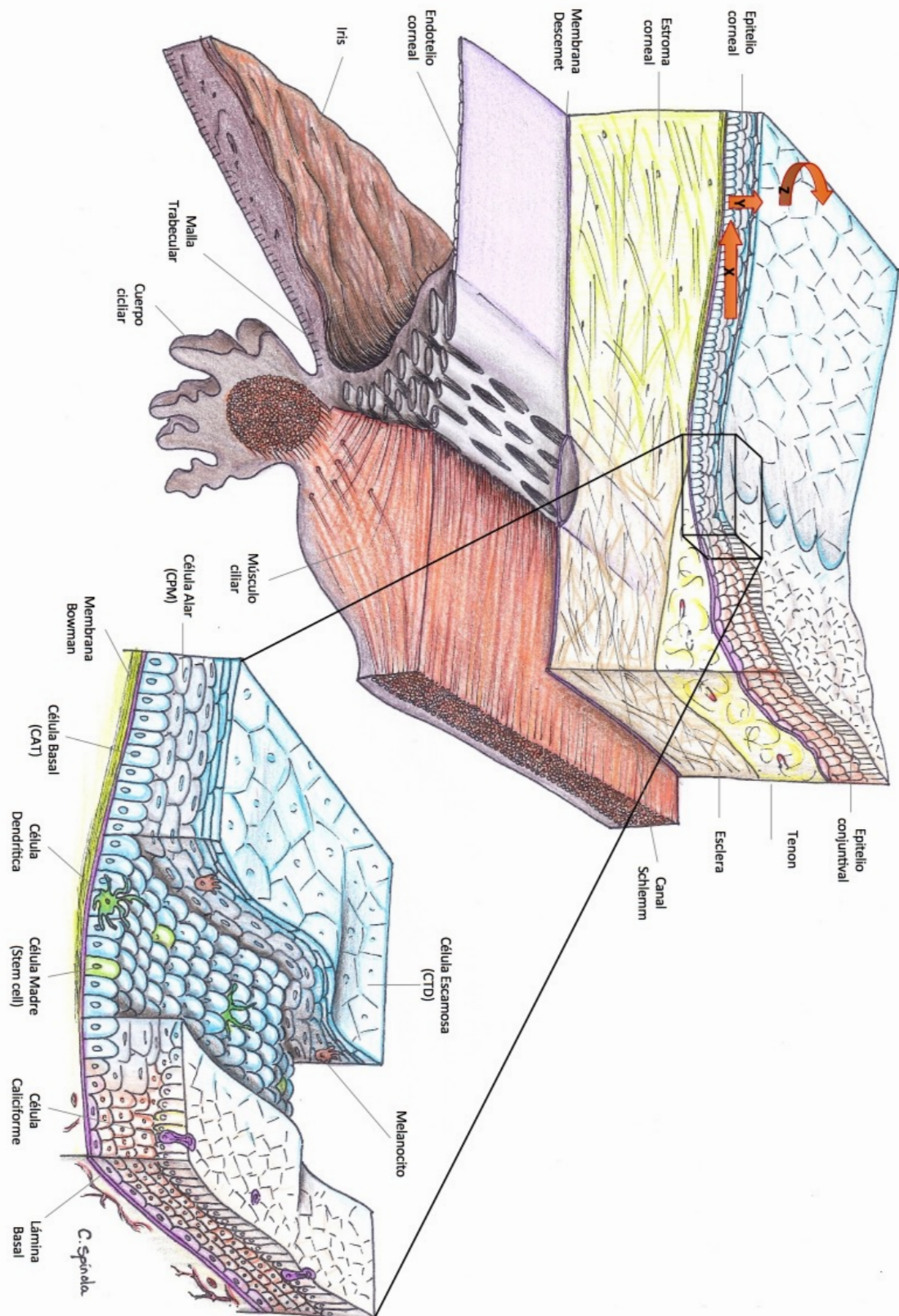
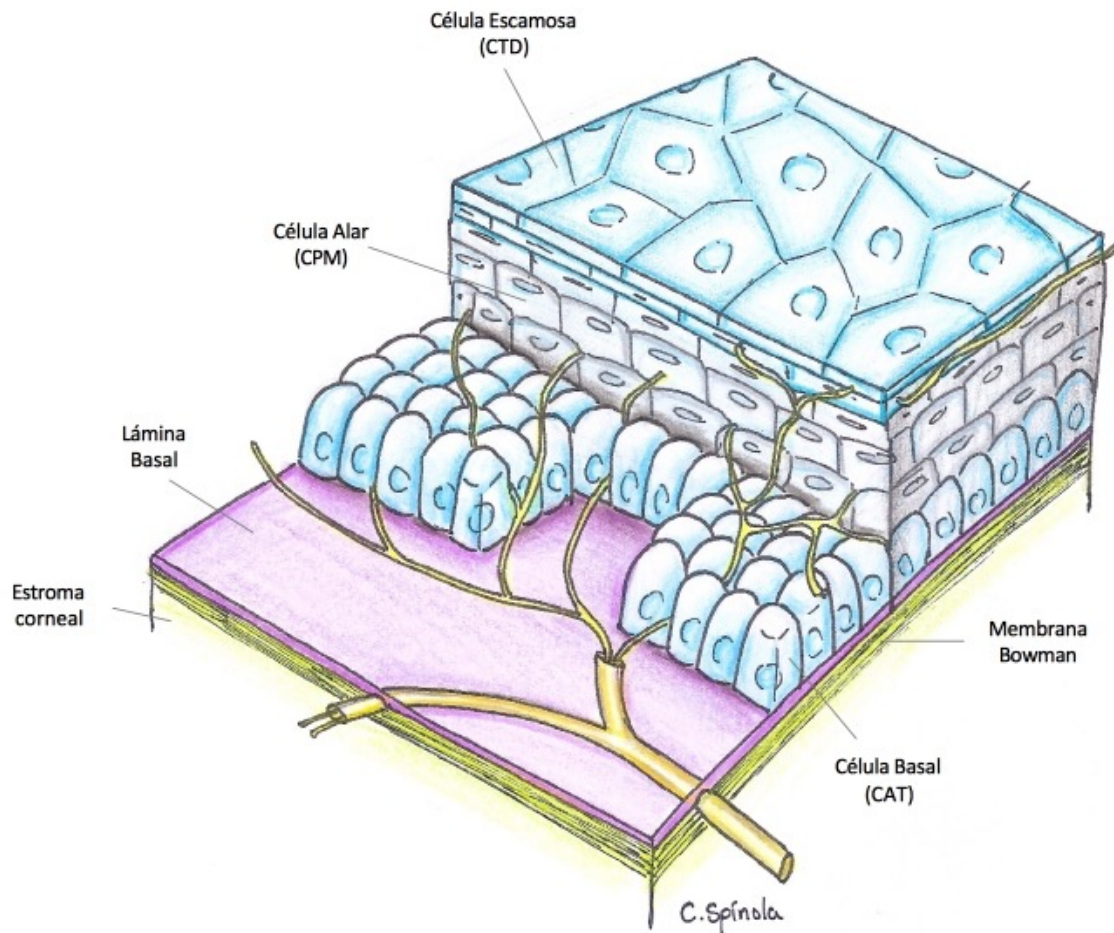


FIGURA 2. LIMBO ESCLEROCORNEAL E HIPÓTESIS DE THOFT.

citoplasma y ricas en tonofilamentos de queratina(50). La capa de células superficiales, aún con menos citoplasma, está formada por dos a cuatro capas de células y en su zona más anterior contienen *microvilli* que contactan con la lágrima(51) (**figura 2**).

En el epitelio corneal no existen células de Langerhans ni melanocitos como si ocurre en el epitelio limbar, además al no tener vasos sanguíneos goza de un privilegio inmunológico que lo hace imprescindible en los trasplantes corneales. Las células epiteliales corneales obtienen la glucosa, los aminoácidos y las vitaminas del humor acuoso y el oxígeno por difusión a través de la lágrima. Cuando se cierran los párpados la presión parcial de oxígeno en la lágrima cae y entonces se obtiene desde los vasos conjuntivales. La inervación sensitiva corneal proviene de la división oftálmica del nervio trigémino que a través de ramas de los nervios ciliares largos entran por las zonas nasales y temporales corneales mediante fibras amielínicas formando el plexo nervioso subepitelial o subasal que penetra hacia las células epiteliales formando botones dendríticos (49)(**figura 3**). Los receptores sensitivos corneales son de tres tipos: mecanorreceptores(estímulos mecánicos), termorreceptores(frío) y receptores polimodales nociceptivos que responden a estímulos térmicos (temperaturas extremas), mecánicos y químicos (ácidos, acetilcolina, NaCl y PGE2), principalmente irritantes y mediadores inflamatorios endógenos. Estos receptores han sido estudiados con el estesiómetro de Belmonte(52, 53). La reproducibilidad de este estesiómetro ha sido estudiada por Tesón y colaboradores, siendo más alta para los estímulos mecánicos y el calor frente al frío y estímulos químicos(53). Las principales ventajas del estesiómetro de Belmonte frente al clásico Cochet-Bonnet(54), es la condición de no contacto (separación de 5 mm con el *tip*) y la exploración de todos los receptores sensitivos corneales que realiza.



**FIGURA 3. EPITELIO CORNEAL Y PLEXO NERVIOSO SUBASAL.**

Los neurotransmisores segregados por estas terminaciones nerviosas condicionan la diferenciación, proliferación de las células epiteliales de la córnea. Un ejemplo dramático de este hecho es la queratopatía neurotrófica, consecuencia de la denervación corneal producida entre otros fenómenos por la disminución de neurotrofismo corneal (49).

El *epitelio conjuntival* es un epitelio columnar estratificado no queratinizado. Es similar al corneal salvo que el conjuntival a diferencia de aquel está ricamente vascularizado, se agrupa de una forma menos homogénea, sus uniones intercelulares son menos frecuentes que en la cornea y su interdigitación es incompleta, dejando mayores



espacios intercelulares que permite el paso con mayor facilidad de anticuerpos, células inflamatorias y fármacos. Este hecho es el causante de la tinción tardía persistente con fluoresceína, fenómeno definitorio de la conjuntivalización sobre la córnea característica de la IL. Por otro lado, a diferencia del epitelio corneal, el epitelio conjuntival dispone además de otras células, secretoras de mucina, denominadas caliciformes o con el término anglosajón “*goblet cell*”(50). Estas células expresan el gen MUC5AC, el cual es muy interesante desde el punto de vista diagnóstico como marcador del tejido conjuntival cuando éste invade la córnea(55). Aunque existen varias publicaciones donde se menciona la citoqueratina 19 como específica de epitelio conjuntival, otras más recientemente informan que las citoqueratinas 7 y 13 junto con las mucinas MUC1 y MUC5AC son más específicas(56). Sus células madre se encuentran en zonas pigmentadas y de mayor grosor siendo el fórnix una de las estructuras ricas en estas células, aunque este es un tema aun un poco controvertido(57). Las células madre conjuntivales son bipotenciales, es decir se pueden dividir en células epiteliales o en células caliciformes(58). También el limbo esclerocorneal puede ser una localización de células madre conjuntivales(57). Pueden permanecer estacionarias y activarse en función de la necesidad de regeneración (59).

Las células basales de la córnea expresan queratina 5/14 al igual que las células basales de la epidermis. Sin embargo, la queratina 3/12 (64 kiloDalton) es específica del epitelio corneal al no encontrarse ni en epidermis ni en conjuntiva (14).

Las células de la córnea mueren por apoptosis y se descaman en la zona central corneal en un periodo que dura aproximadamente 7 días. Los mecanismos de regulación no están claros, aunque el microambiente que rodea a estas células limbares está fuertemente ligado a dicha regulación(1). Dicha renovación sigue la hipótesis del movimiento de las células epiteliales corneales en los ejes XYZ descrita por Thoft en 1983(60). Thoft describió

un movimiento de renovación epitelial en los ejes X,Y y Z desde el limbo hasta el centro de la córnea: el X sería la proliferación de células basales; el Y, la proliferación y migración centrípeto celular y el Z, la descamación de células corneales (**figura 2**). El mantenimiento del epitelio corneal depende del equilibrio en la ecuación  $X+Y=Z$ , que representa el balance entre la pérdida celular y el reemplazo(61). El componente X e Y ocurre en estado basal, sin agresión externa, por lo que no hay que confundirlo con un desplazamiento de células periféricas en respuesta a un defecto central agudo, fenómeno aditivo a la renovación normal (movimiento X e Y) (62).

El epitelio limbar es una transición gradual desde el epitelio conjuntival al corneal. Está compuesto por siete a diez capas de células siendo la zona basal donde residen las células madre limbares o “limbal stem cell”. La proliferación de las células madre limbares ocurre por dos vías y con funciones diferentes(49):

- Por un movimiento centrípeto y diferenciación hacia células amplificadoras transitorias (CAT) que forman parte de la capa basal del epitelio corneal. Las CAT luego se transforman en células postmitóticas suprabasales(CPM), que son las células alares del epitelio corneal. Cumple la función de renovación epitelial continua.
- En dirección anterior, actuando como barrera entre los dos epitelios, el conjuntival y el corneal, en una proliferación de avance hacia la superficie.

Estas células madre limbares componen sólo el 0,1-10 % de la población total de células basales(19). Las células madre se encuentran en todos los tejidos que se renuevan como el sistema hematopoyético, intestino y epidermis, en los cuales se ha demostrado su presencia.

Las células madre limbares provienen del ectodermo neural, siendo una característica que lo confirma la presencia de receptores a neurotransmisores como GABA, dopamina o serotonina(63).

Las células madre tienen alta tasa de proliferación con baja diferenciación, una vida larga, ciclos lentos de replicación, potencialidad, plasticidad, están alojadas en un “*nicho*” influenciadas por un “*microambiente*” y presentan una división asimétrica(18).

Las células madre tienen el *potencial* de producir diferentes linajes de células. Existen según ese potencial diferentes tipos. Las células del cigoto que pueden dar lugar a todo tipo de células, del embrión y de la placenta, se llaman *totipotenciales*. Las células de las tres capas germinales, embrionaria u hojas blastodérmicas como son el ectodermo, mesodermo y endodermo, son *pluripotenciales*. Dan lugar a toda una estirpe celular dentro de una capa germinal. La mayoría de células madre o *stem cell* del organismo, son *multipotenciales*, pueden dar lugar a varios tipos celulares. Las células madre limbares y las de la epidermis son *unipotenciales*, sólo dan lugar a una única estirpe celular específica(64).

Otra característica es la *plasticidad*, es decir, la capacidad de producir células de otra estirpe al situar dichas células en otra localización distinta, donde al cambiar el “microambiente”, factores de crecimiento, citoquinas y distintas sustancias, también cambian la estirpe celular que producen(65). Por esta característica, se están usando tejidos de otra localización como de la mucosa oral para el reemplazo limbar(66).

El *nicho* da protección y nutrición a las *stem cell*(48). De hecho, Dua en 2005 y Shortt en 2007, situaron dicho nicho en las criptas limbares epiteliales, aunque las células madre del epitelio corneal también se han encontrado en otras localizaciones (42, 43), como hemos mencionado anteriormente.

La *división asimétrica* consiste en la capacidad de que cada célula madre limbar se divida en dos tipos celulares por cada división, produciendo otra célula madre limbar, reponiendo así el *pool* de células madre y por otro lado, una célula amplificada transitoria (CAT) destinada a formar parte del epitelio corneal. Esta división puede producirse también en el sentido de que una célula madre limbar produzca dos CAT y otra célula madre limbar produzca dos células madre limbares(67), siendo la paridad la misma. Las CAT seguirán la ruta centrípeta descrita en la hipótesis de Thoft, en un proceso por el cual se irán diferenciando, primero en células postmitóticas o alares y luego en células totalmente diferenciadas. Las células madre limbares y las CAT son el compartimento proliferativo de la superficie corneal. Aunque las CAT tiene un potencial proliferativo mas limitado, se dividen con más frecuencia y dan lugar a células ya en proceso de diferenciación que ya no son capaces de dividirse: las células postmitóticas o alares. En cierto momento y a medida que se alejan del nicho, las CAT cesan sus mitosis, dejando de proliferar y pasando a la diferenciación celular terminal. Conforme las CAT se mueven centrípetamente van adquiriendo marcadores de diferenciación celular corneal, como las citoqueratinas (CK) 3/12, dejando atrás su fenotipo más similar a células madre limbares. Por otro lado, la capa basal del epitelio limbar contiene tanto células madre como CAT así como precursores tempranos entre ambos tipos celulares. Las CAT se encuentran en la capa basal del epitelio corneal formando la capa de células basales. El epitelio corneal periférico contiene CAT con capacidad de múltiples divisiones. En el epitelio central, estas CAT sólo tiene capacidad de dividirse una sola vez. Este hecho coincide con el hecho de que las colonias provenientes del epitelio central de la córnea no pueden ser cultivadas más de dos veces(59).

Además de la vía centrípeta, también pueden migrar en su proceso de diferenciación hacia la superficie del limbo. Éste proceso parece ser muy importante para ejercer de barrera

entre los dos epitelios, el conjuntival y el corneal (68) (**figura 2**). No se conoce claramente el mecanismo por el que se regula que una célula madre limbar se divida en una célula amplificada transitoria o en otra célula madre para su repoblación, y tampoco si después de dividirse en una célula transitoria amplificada, va hacia la superficie limbar o hacia el centro corneal(50). Se ha postulado que una CAT puede pasar de nuevo al estado de célula madre limbar en determinadas condiciones(31).

En el proceso de cicatrización, el epitelio corneal utiliza tres estrategias para aumentar el reclutamiento celular y así repoblar la zona de agresión. Una sería el reclutamiento de células madre para producir mas CAT. Otro, el aumento de replicación de las CAT. Por último, el aumento de eficacia de la replicación de las CAT reduciendo el ciclo celular(69).

### **I.3. SÍNTOMAS Y SIGNOS CLÍNICOS DE LA INSUFICIENCIA LIMBAR**

La insuficiencia limbar (IL) se define como una incapacidad por parte de las células madre limbares de regenerar el epitelio corneal y por tanto, significa el fracaso de la renovación del epitelio corneal y sus consecuencias. El paciente manifiesta hiperemia, molestias, dolor punzante, fotofobia, e incluso déficit visual. En lámpara de hendidura podemos explorar las empalizadas de Vogt donde son más numerosas, en la zona superior e inferior limbar, aunque no son fáciles de encontrar en todos los pacientes, incluso un 20 % de personas sanas no las presentan. Son más fáciles de localizar en pacientes jóvenes y de alta pigmentación. Por otra parte, la tinción tardía y persistente con fluoresceína del epitelio conjuntival invasor es frecuente (24). A este fenómeno se le denomina *conjuntivalización*, por la cual la superficie corneal es invadida desde la periferia por un epitelio de características conjuntivales, más friable, opaco, irregular y permeable que el epitelio corneal sano. La conjuntivalización es el signo distintivo de la IL ya que pone de manifiesto el fracaso de la barrera limbar con respecto al epitelio conjuntival que invade la córnea(70):

*“The hallmark of limbal stem cell deficiency is ‘conjunctivalisation’ of the cornea and the most significant clinical manifestation is a persistent corneal epithelial defect”<sup>2</sup>*

Algunos autores consideran la conjuntivalización, la vascularización corneal y la lenta reparación epitelial con erosiones epiteliales recurrentes una triada de signos patognomónicos de la IL(59). Esto es debido a que en la conjuntivalización, ese epitelio anómalo tiene menos adhesión, se desprende más fácilmente, la visión está comprometida y ocurre la difusión de la tinción a capas profundas por hiperpermeabilidad. Esta se traduce en

---

<sup>2</sup> En este texto Harminder S. Dua describe sobremanera, el signo y el síntoma principales de la IL

la posibilidad de paso de leucocitos al estroma corneal iniciando la cascada inflamatoria y sus conocidas consecuencias(68). Posteriormente, y debido a esta inflamación persistente, sobreviene una queratitis punctata superficial y los defectos epiteliales recurrentes que pueden llegar a la ulceración corneal, neovascularización y desarrollo de pannus. Si el pannus llega a nivel central, se producirá deterioro visual, cicatrización estromal con leucomas e incluso, “*melting*” y perforación. La neovascularización es frecuente debido a que estas células conjuntivales no tienen capacidad de segregar factores antiangiogénicos como si lo hace el epitelio corneal sano (71).

A finales de los años 70 y principios de los 80 se describieron casos de reepitelización corneal normal tras una conjuntivalización(72). Se postuló que las células madre corneales estaban en esa conjuntiva invasora existiendo una transdiferenciación de células conjuntivales a corneales(73). Más tarde se desbancó esta teoría por otra donde la causa de la espontánea recuperación se debía probablemente a células madre limbares remanentes en casos de insuficiencia limbar parcial(50).

Dua et al. exponen los signos encontrados en la IL desde leve a más severa en este orden(70):

1. Pérdida de anatomía limbar. Se pierden las empalizadas de Vogt y la red vascular limbar.
2. Epitelio anómalo que invade córnea, siendo fino e irregular (conjuntivalización). Cuando la IL sea parcial se verá una zona cuneiforme de este epitelio anómalo de base limbar.

3. Tinción persistente de dicho epitelio corneal. Debido a la mayor permeabilidad en las zonas de conjuntivalización, habrá una tinción con fluoresceína persistente, parcheada y que puede llegar a estroma subyacente.
4. Película lagrimal inestable.
5. Erosiones y defectos epiteliales incluso con filamentos epiteliales.
6. Neovascularización corneal superficial y profunda.
7. Defectos epiteliales persistentes que llevan a ulceración corneal, “*melting*” e incluso perforación.
8. Pannus fibrovascular.
9. Cicatrización, queratinización y calcificación corneal. En este estadio el paciente ya no siente tantas molestias ya que la inflamación ha empezado a disminuir. Si hay un ojo seco severo, la queratinización será la norma.

Aunque el diagnóstico es principalmente clínico, a veces son necesarias otras pruebas, sobretudo si vamos a realizar un tratamiento quirúrgico. Si además éste implica al ojo adelfo como en el autoinjerto del ojo contralateral, hay que asegurarse que éste no tenga ninguna patología limbar. De esta guisa, encontramos que las células caliciformes en córnea son un marcador histológico excelente de conjuntivalización y por ende, de insuficiencia limbar.



## **I.4. CRITERIOS Y PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LA INSUFICIENCIA LIMBAR**

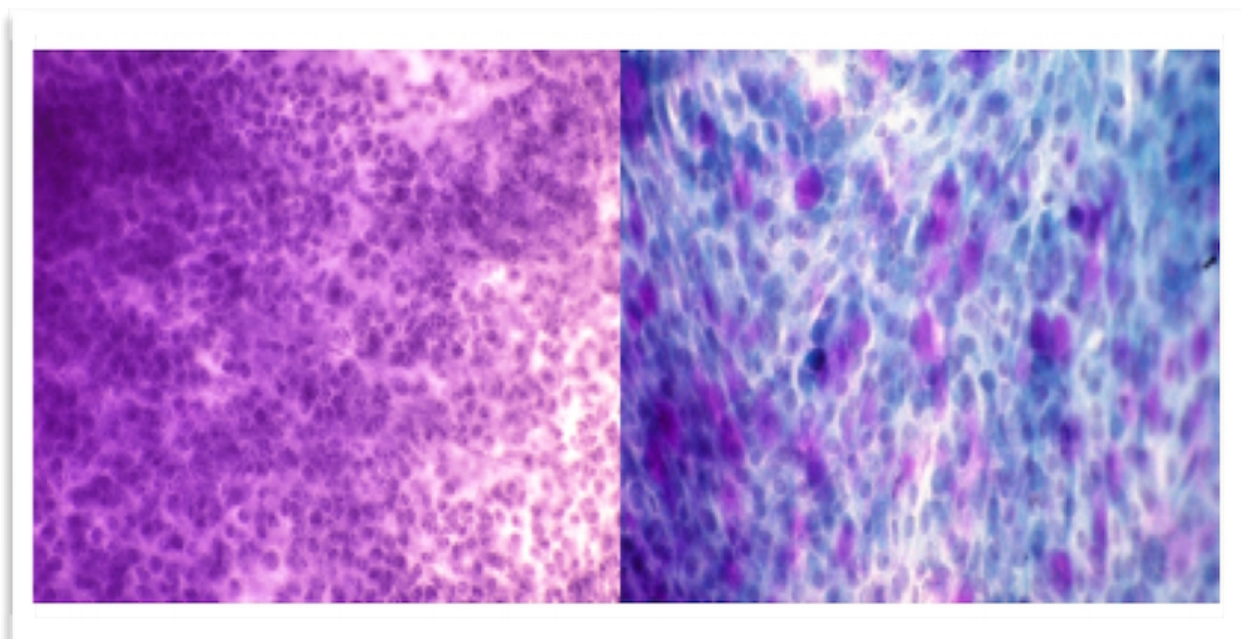
Existen actualmente varios métodos, aunque la mayoría buscan identificar, o bien las propias células caliciformes típicas del epitelio conjuntival, o bien marcadores propios de estas células.

### **I.4.1. BIOPSIA EXCISIONAL**

Uno de éstos métodos sería la biopsia excisional, realizada en el momento de la cirugía o previamente, que mediante el análisis anantomopatológico y asistido por diferentes tinciones como el azul alcian y ácido peryódico-Schiff (PAS), consigue identificar dichas células(68).

### **I.4.2. CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN**

Por otro lado, tenemos la citología de impresión, que se prefiere a la anterior por ser menos invasiva(74), pero tiene el gran inconveniente de tener una baja sensibilidad (75). Por esta razón, no es una prueba fiable para descartar la IL en un ojo al que vamos a usar como donante para tratamiento quirúrgico limbar y es a efectos visuales, un ojo único. La citología de impresión evalúa la capa superficial de las células del epitelio conjuntival y corneal. Dependiendo de la patología del paciente pueden variar pero el epitelio conjuntival sano debe contar con numerosas células caliciformes, células epiteliales no queratinizadas y ausencia de células inflamatorias (**figura 4**). Por el contrario, en el epitelio corneal no debe haber células caliciformes. La citología de impresión puede usarse sinérgicamente con técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular, ganando sensibilidad y especificidad.



**FIGURA 4. CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN DE MUESTRA CORNEAL.**

*Con fenotipo epitelial normal (izquierda) y de muestra corneal con presencia de células caliciformes (derecha).*

De hecho, la citología de impresión es “una herramienta muy poderosa para establecer de forma objetiva el diagnóstico de insuficiencia límbica y también para controlar su evolución en el tiempo”(76). Para realizarla, se usa un papel de nitrocelulosa y bajo anestesia tópica se presiona éste sobre el ápex corneal impregnándose las células en dicho papel que posteriormente al teñirlo con PAS y hematoxilina-eosina se valora la presencia o ausencia de células caliciformes (Figura 5). No obstante, también se ha usado la detección de la citoqueratina Ck19 en muestras de citología de impresión. Sacchetti describió una sensibilidad del 82 % detectando Ck19 en citología de impresión mientras la detección de células caliciformes aislada fue tan sólo del 59 % por lo que una ausencia de células caliciformes en la citología de impresión no descarta la conjuntivalización ni el diagnóstico de IL(75). García y colaboradores encontraron citologías de impresión con células caliciformes en tan sólo un 36,2 % de pacientes diagnosticados de insuficiencia limbar (77). El grupo de trabajo de Scorsetti refrenda este hecho al describir que existen casos en los estando presentes signos clínicos de IL no se encuentran evidencias citológicas en la

citología de impresión(59). Puangsricharern et al. justifican este hecho por diferentes motivos (74):

- Existe sólo un deterioro parcial de la población celular limbar, por lo que el resto de población funcionante consigue mantener el ritmo de renovación celular y mantener la integridad epitelial.
- La citología de impresión no sea una prueba suficientemente sensible.
- En algunos pacientes con IL no se observan células caliciformes en epitelio invasor en la zona corneal, sino sólo metaplasia o queratinización (como puede ocurrir en el Síndrome de Stevens-Johnson o en algunas causticaciones)
- En una IL subclínica o precoz.

En este último punto, hay que reseñar que es sabido que la presencia de células caliciformes en el epitelio invasor sobre la córnea, es un fenómeno tardío de esta enfermedad. Por ello, el diagnóstico precoz es obviamente un objetivo a conseguir en estos enfermos para mejorar el manejo, tratamiento y prevención de las complicaciones(78).

### **I.4.3. RT-PCR MUC5AC (LIMBOKIT®)**

Por último y más recientemente, la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa(RT-PCR) del transcrito MUC5AC, mucina que se presenta en las células caliciformes. Se realiza obteniendo una muestra del mismo modo que en una citología de impresión con un parche de nitrocelulosa aplicada al centro corneal, teniendo que ser exquisito a la hora de no tocar la conjuntiva (79) (figura 5). Esta muestra se introduce en un bote para su posterior análisis en el laboratorio. Dicha prueba es más sensible y específica que la citología de impresión, siendo su sensibilidad del 94,9%(55).

Iker García y colaboradores informaron en 2013, de una sensibilidad y especificidad de esta prueba de 98% y 89% respectivamente. Estos autores presentaron en 2012 un trabajo comparando la citología de impresión y la RT-PCR de la MUC5AC, obteniendo que de 47 muestras tomadas en diferentes días con ambas pruebas y a los mismos pacientes diagnosticados clínicamente de IL, el 36,2 % fueron positivas en las dos pruebas, pero por el contrario el 57,5 % fueron negativas en la citología de impresión y positivas en la RT-PCR. Un 6,3% aparte, no fueron valorables en la citología de impresión debido a escasez de la muestra. Esto último es otro inconveniente de la citología de impresión que requiere de una muestra suficiente mientras que la RT-PCR al ser tan sensible por la amplificación del RNA requiere de menor cantidad de muestra. Calculan dichos autores que el punto de corte de concentración de ARN necesaria es mayor de 1,2 ng/μl.

## **I.5. MICROSCOPIA CONFOCAL**

### **I.5.1.INTRODUCCIÓN E HISTORIA**

La gran escalada tecnológica llevada a cabo en oftalmología, en concreto del estudio de la superficie ocular, en estas tres últimas décadas ha traído consigo unas tecnologías que ya son casi indispensables en nuestra práctica clínica diaria. Sirva de ejemplo la topografía corneal, la tomografía de coherencia óptica o la biomicroscopía ultrasónica. De estas técnicas obtenemos curvatura corneal y cortes macroscópicos, que cada vez son más detallados y aportan mayor resolución. Pero si a un retinólogo se le dijera que podemos ver en vivo y en directo y de forma no invasiva los conos, los bastones, las células de Müller,... tendría que verlo para creerlo, sería un sueño hecho realidad. Pues bien, la microscopía confocal nos aporta a los cirujanos de polo anterior dicha capacidad. La microscopía confocal *in vivo* nos permite ver detalles histológicos *in vivo*, excluyendo las desventajas de la histología *ex vivo* como son la degeneración tisular por desvitalización, los artefactos, la imposibilidad de seguir la evolución histológica de una enfermedad o la respuesta a un tratamiento -una biopsia no se puede repetir *sine die*- y por supuesto, ser muy invasiva.

La microscopía confocal es un método diagnóstico no invasivo que se encuentra incluido dentro de la microscopía óptica, concretamente de la microscopía de fluorescencia. El principio de la microscopía confocal está basado en la eliminación de la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera del foco. Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra a estudio y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores(80).

Un microscopio confocal es básicamente un microscopio óptico que incluye una fuente de luz láser y un sistema electrónico que ayuda a la captación de imágenes. Gracias a

ello se consigue, por un lado, un aumento en la resolución y por otro, la obtención de imágenes de secciones ópticas extremadamente finas, eliminando así la interferencia que produce la luz que llega de los diferentes campos ópticos de todo el grosor de la muestra a estudio, consiguiendo así que el enfoque se realice sobre un único plano (confocal). Por ello, y debido a que las imágenes obtenidas son imágenes digitales, se pueden obtener aumentos superiores a la microscopía óptica(81).

El tipo de muestra que se puede analizar con un microscopio confocal es muy variado. Los más usuales son cortes de tejidos animales y vegetales, células en cultivo y superficie de metales. En cambio, en el campo de la oftalmología la exploración se realiza directamente sobre el ojo, existiendo un contacto mínimo con la córnea.

Goldmann en 1939 fue el primero en describir el microscopio confocal(82). Marvin Minsky fue la primera persona que patentó el microscopio confocal en 1957 (**figura 5**; US 3013467A; fecha de presentación 1957, fecha de publicación 1961)(83), pero hasta la década siguiente no se construyó un dispositivo mecánico con estas características por Eggar y Petran. Con la llegada de los ordenadores, el láser y el procesamiento digital de las imágenes fue cuando realmente empezó a utilizarse para análisis de muestras biológicas en laboratorios.

En 1968 salió el primer Microscopio confocal de barrido láser(84). Éste, a través de numerosas mejoras, consiguió obtener imágenes microscópicas *in vivo* muy similares a las de un corte histológico pero mediante una técnica mínimamente invasiva, sin necesidad de fijación ni tinciones y con un relativo bajo coste en fungibles. Ya en 1990 salen los primeros artículos analizando la córnea con los trabajos de Master BR y del grupo de Cavanagh HD y Jester JV (85).

Dec. 19, 1961

M. MINSKY

3,013,467

MICROSCOPY APPARATUS

Filed Nov. 7, 1957

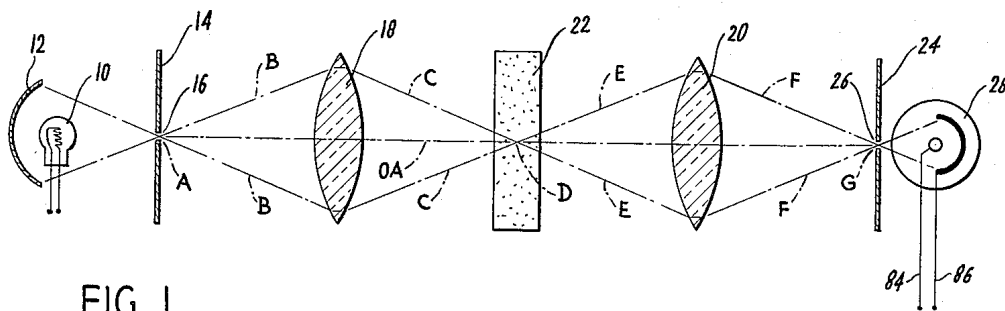


FIG. 1.

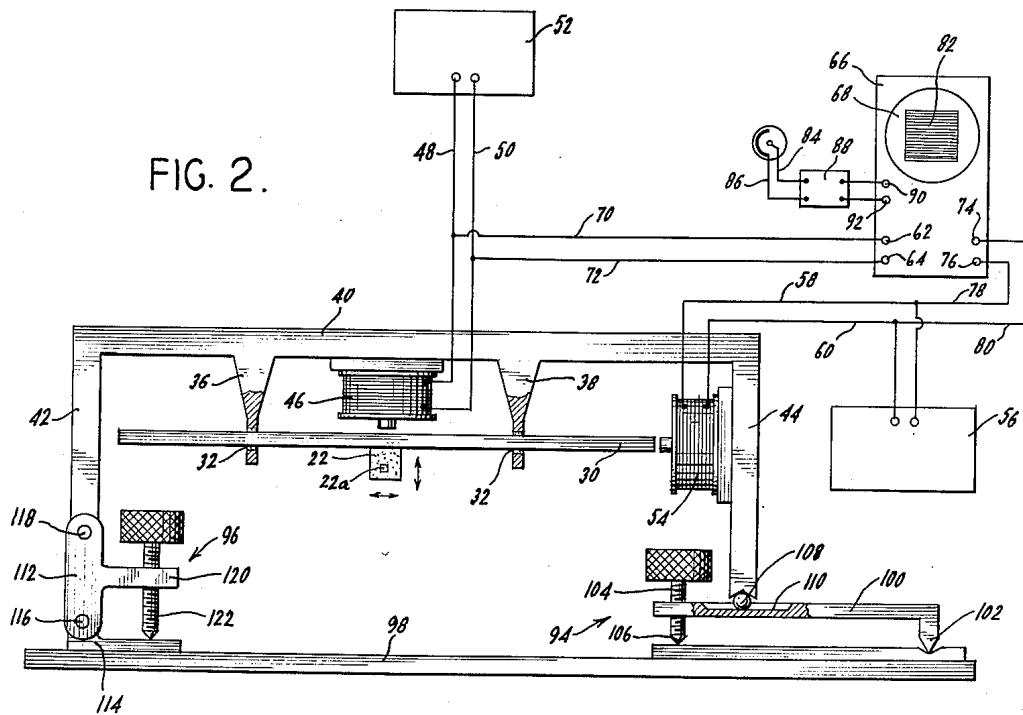


FIG. 2.

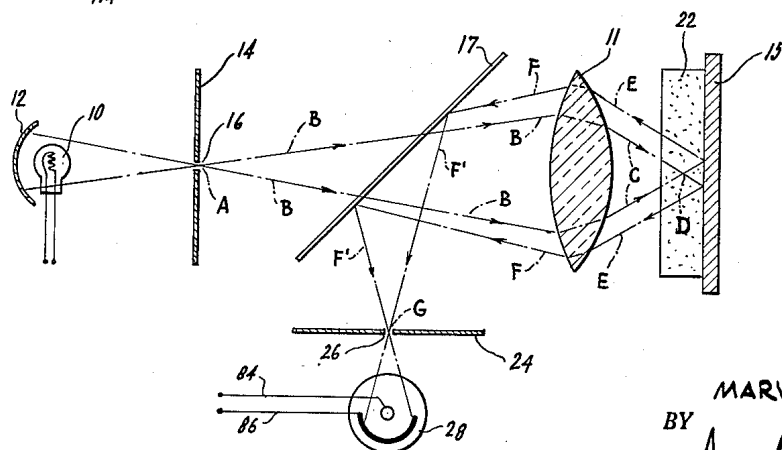


FIG. 3.

INVENTOR.  
MARVIN MINSKY  
BY  
*Amster & Levy*  
ATTORNEYS

### I.5.2. COMPONENTES DE UN MICROSCOPIO CONFOCAL

Los principales componentes de un microscopio confocal son (86):

1. El láser, como fuente luminosa temporal, que focaliza el haz de luz en un solo punto de la muestra, de modo que barre la muestra plano a plano, creando multitud de imágenes bidimensionales que un ordenador interpreta, generando finalmente una imagen tridimensional del objeto a estudio.

2. Diafragmas que limitan la accesibilidad del haz. Se encuentran situados antes y después de la lente, permitiendo enfocar la iluminación en un único punto.

- Un diafragma de iluminación localizado tras la fuente luminosa denominado “*pinhole* de excitación”, cuya utilidad es eliminar la luz proveniente de planos superiores e inferiores al plano focal, aumentando con ello la claridad y resolución de la imagen.

- Un diafragma de detección, de tamaño variable situado entre la lente y el fotodetector, denominado “*pinhole* de emisión”.

3. Software que permite mejorar la calidad de la imagen por disminución de la sensibilidad de los fotodetectores a intensidades bajas de fluorescencia, con lo que se reduce el ruido de fondo.

Algunos factores, como la apertura variable del *pinhole*, la precisión, número y velocidad del barrido pueden influir en la obtención de una buena imagen(87).

### I.5.3. TIPOS DE MICROSCOPIOS CONFOCALES

Actualmente existen tres sistemas de microscopía confocal (88-91):



- *Tandem Scanning Confocal Microscope* (TSCM). Tiene una resolución de 24 $\mu$ m. Ya no está disponible comercialmente. En este microscopio el *pinhole* de detección es sustituido por un disco giratorio *Nipkow* con cientos de aperturas agrupadas en pares, lo que disminuye la interferencia de luz entre ellos mediante el principio de la espiral de Arquímedes y así barrer la muestra con múltiples puntos de luz simultáneamente(92).

- *Slit Scanning Confocal Microscope* (SSCM). Llegan a una resolución de 9 $\mu$ m. Se emplea un haz de láser fijo y la preparación se rastrea mediante la utilización de una platina motorizada en el microscopio. Entre éstos están el *ConfoScan P4* (Tomey Corporation, Cambridge, MA, USA), el *ConfoScan 4* (Nidek Technologies, Gamagori, Japón) y Microphthal (Helmut Hund, Wetzlar, Alemania).

- *Laser Scanning Confocal Microscope* (LSCM). Alcanzan una resolución de 7,6  $\mu$ m. En este caso el barrido se realiza moviendo el haz de láser, gracias a unos espejos galvanométricos que permiten modificar el punto de incidencia del haz de láser en el ojo. Sólo existe disponible comercialmente un LSCM, el *Heidelberg Retina Tomograph III* (*Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Alemania*), aunque la versión II es la que se ha usado para este trabajo. Para estudiar la córnea y conjuntiva se debe incorporar e este microscopio el módulo Rostock Corneal Module (RCM)(**figura 6**).

La ventaja del Confoscan 4 es que no tiene que aplanar la córnea mientras que el HRT II y III con el RCM si. Como desventaja, el Confoscan 4 tiene dificultad a la hora de visualizar estructuras fuera del centro corneal. El HRT tiene mayor resolución, mide profundidad con mayor exactitud y puede penetrar mejor en tejidos más opacos como la conjuntiva debido a su luz de longitud de onda infrarroja (670nm, láser clase 1)(93).



**FIGURA 6. MICROSCOPIO CONFOCAL LASER SCANNING HRT CON MÓDULO DE CÓRNEA ROSTOCK**

La precisión en la medida del espesor de la córnea está limitada por su movimiento durante la exploración. El contacto entre la córnea y las lentes del objetivo del *Tandem Scanning* estabiliza la córnea para que las diferencias en medidas consecutivas sean inferiores a 25  $\mu\text{m}$ (85, 90). Otros microscopios, como el ConfoScan (z-CS4), han introducido sistemas para reducir el movimiento entre la córnea y el objetivo.

Estos microscopios debido a sus diferencias también obtienen medidas diferentes. En la **tablas 1, 2 y 3** se muestran los distintos resultados de densidades celulares del epitelio

corneal y de los nervios del plexo nervioso subasal corneal. Los microscopios confocales LSCM tiene mayor contraste que los SSCM y además estos últimos, en los bordes de la imagen obtenida pierden más contraste aun por lo que los datos de densidad de nervios son mayores en LSCM que en SSCM(87).

Tabla 1. Densidad celular del epitelio corneal en personas sanas

DENSIDADES CELULARES	Mustonen 1998	Vanathi 2003	Benítez del Castillo 2004	Eckardt, Stave & Guthoff 2006	Niederer 2007	Deng 2012	Lagali 2013
C.Superficiales (zona central, cels/mm <sup>2</sup> )	1213 (370)		1529 (341, <60años) 1523 (294, ≥60años)	840 (295)			
C. Alares (zona central, cels/mm <sup>2</sup> )				5070 (1150)			
C. Basales (zona central, cels/mm <sup>2</sup> )	5699 (604)	3601 (408)	5783 (841, <60años) 5615(624, ≥60años)	8996 (1532)	6000 (1080)	9373 (483)	5467 (403)
C. Basales (zona periférica, cels/mm <sup>2</sup> )				10139 (1479)			
Ojos	58	74	41	92	85	12	18
Microscopio confocal	SSCM	SSCM	SSCM	LSCM	LSCM	LSCM	LSCM

Se expresan datos en media y en paréntesis, su desviación estándar

Tabla 2. Densidad de células del epitelio corneal y de nervios del plexo subasal en paientes con IL.

DENSIDADES CELULARES	Miri, Nubile & Dua 2012	Deng 2012	Lagali 2013 (Aniridia)
C.Superficiales (zona central, cels/mm2)	2245(248, total)		
C. Alares (zona central, cels/mm2)	3830(347)		
C. Basales (zona central, cels/mm2)	6329(539;parcial)- 3785(410; total)	5029(2323)	4344(749)
Nervios del plexo nervioso subasal corneal	4260(total)-9700(parcial) $\mu\text{m}/\text{mm}^2$	31,9 nervios/mm2	9100(8100) $\mu\text{m}/\text{mm}^2$
Ojos	17 (total) 6(parcial)	27	40
Microscopio Confocal	LSCM	LSCM	LSCM

Se expresan datos en media y en paréntesis, su desviación estándar

Tabla 3. Densidad de nervios del PNSB en  $\mu\text{m}/\text{mm}^2$  en sanos

	Grupcheva 2002	Benítez del Castillo 2004	Erie 2005	Patel 2005	Niederer 2007	Parissi 2013	Lagali 2013
Nervios ( $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ )	632 (287,jóvenes) 582 (327, ancianos)	769 (88, <60 años) 624 (86, ≥60 años)	8404 (2012) $\mu\text{m}/\text{mm}^2$	21668 (1411)	20300 (6500)	19000 (4500)	18300 (3700)
Ojos	50	41	65	3	85	207	58
Microscopio Confocal	SSCM	SSCM	TSCM	LSCM	LSCM	LSCM	LSCM

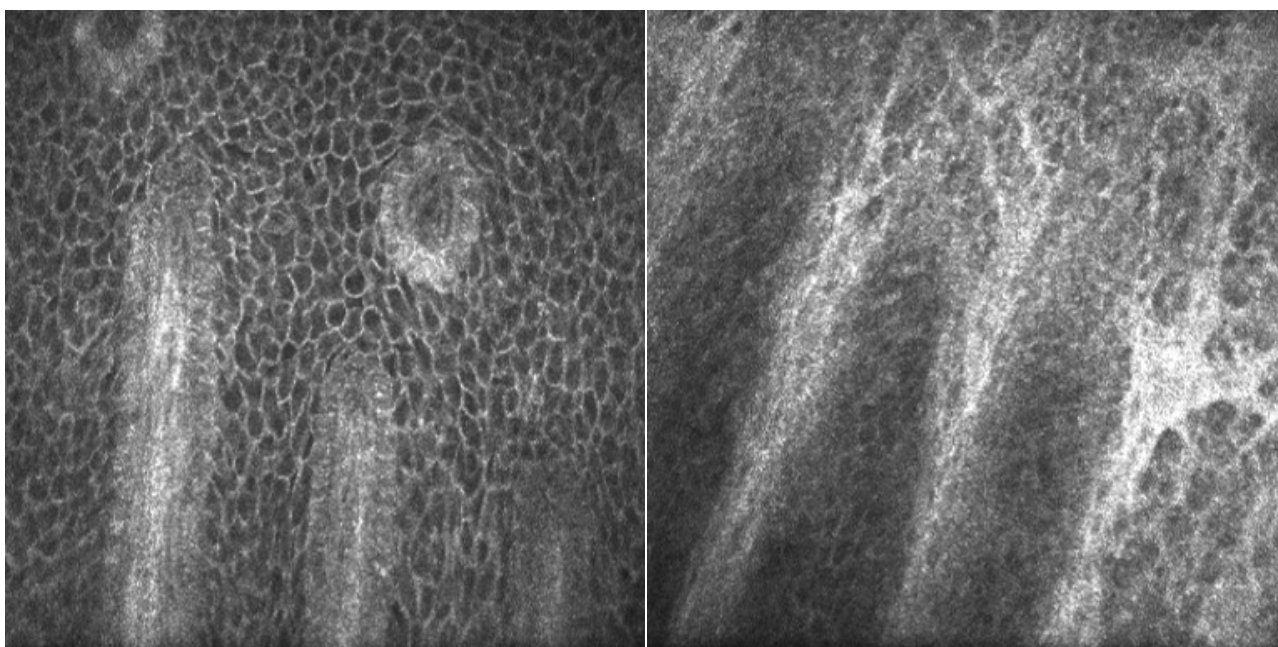
Se expresan datos en media y en paréntesis, su desviación estándar

**I.5.4. MANEJO DEL HRT II CON EL MÓDULO PARA CÓRNEA ROSTOCK**

El módulo Rostock desarrollado en la Universidad de Rostock en Alemania en 2002 permitió usar el HRT inicialmente destinado para analizar la retina y las fibras nerviosas oculares utilizarlo para analizar la córnea acoplándolo por delante del HRT. El poder de magnificación es de 800 veces. También puede tomar imágenes en tres dimensiones tomando series de 46 imágenes secuenciales de dos dimensiones y después la reconstruye. El tiempo de toma de imágenes es de 0,024 segundos para imágenes en dos dimensiones y 4 segundos en la tridimensionales. La resolución óptica verticalmente es de 2  $\mu\text{m}$  y la horizontalmente de 4  $\mu\text{m}$ , siendo la digital de 1  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  tanto vertical como horizontalmente. Además nos aporta la profundidad de la imagen obtenida en micras para poder situar mejor el objeto analizado. Tiene una cámara que nos indica donde estamos tomando la imagen con una cámara CCD (480 por 460 pixeles, RGB, 15 imágenes por segundo) que se sitúa en el lateral de la cabeza del paciente. El rango máximo de enfoque del módulo Rostock es de 1.500  $\mu\text{m}$ . En los modelos actuales se pueden utilizar lentes adicionales con las cuales el campo de visión varía de 250x250  $\mu\text{m}$  a 400x400  $\mu\text{m}$  o bien 500x500  $\mu\text{m}$ , dependiendo de la lente que se utilice. El software permite determinar densidades ya sean celulares, de depósitos, nerviosas, etc. en cada capa corneal, mediante conteo manual, o bien elegir diferentes formatos de impresión. Se ensambla el módulo de córnea en el HRT II para posteriormente colocar el TomoCap (fungible de un sólo uso de plástico que se coloca anterior a la lente del módulo Rostock a modo de protección) con lágrima artificial en gel Viscotears® para mantener la interfase óptica tanto en zona interior como exterior. Al paciente se le instila colirio con anestésico tópico y la misma lágrima artificial en gel Viscotears® en ambos ojos. Luego, se le coloca un blefarostato y se aproxima el paciente a la mentonera para comenzar la prueba.

### I.5.5. APLICABILIDAD

El HRT se ha usado para analizar la retina, el nervio óptico y las fibras nerviosas oculares. Desde la salida del módulo corneal Rostock se pudo usar para estudiar la córnea, conjuntiva, párpados y por supuesto, el limbo esclerocorneal. En limbo ha sido usada tanto para estudiar la anatomía normal como las empalizadas de Vogt y las criptas limbares (**figura 7**), como para describir nuevas estructuras como la “limbal lacuna” del grupo de Deng(45), como para la patología limbar. Deng incluso ha propuesto una novedosa clasificación con confocal de la IL(78). Una de las ventajas de esta técnica que el grupo de Iker García nos refiere con respecto a la RT-PCR del ARN de la MUC5AC (Limbokit®), es la posibilidad de diferenciar entre IL parcial y total, aunque también comenta sus inconvenientes, como el alto coste del aparato y la necesidad de personal experto para su manejo. De hecho refiere que la RT-PCR es mejor para el diagnóstico precoz de la IL por su



**FIGURA 7. CRIPTAS LIMBARES Y EMPALIZADAS DE VOGT.**

*A la izquierda, observamos empalizadas de Vogt y criptas limbares de aspecto normal. A la derecha se observan empalizadas de Vogt desestructuradas, más fibrosadas, sin criptas limbares y menos celularidad, en paciente con IL tras quimioterapia sistémica*

alta sensibilidad, en referencia a que en estos estadios precoces no hay cambios citológicos detectables según ellos por la microscopía confocal(77).

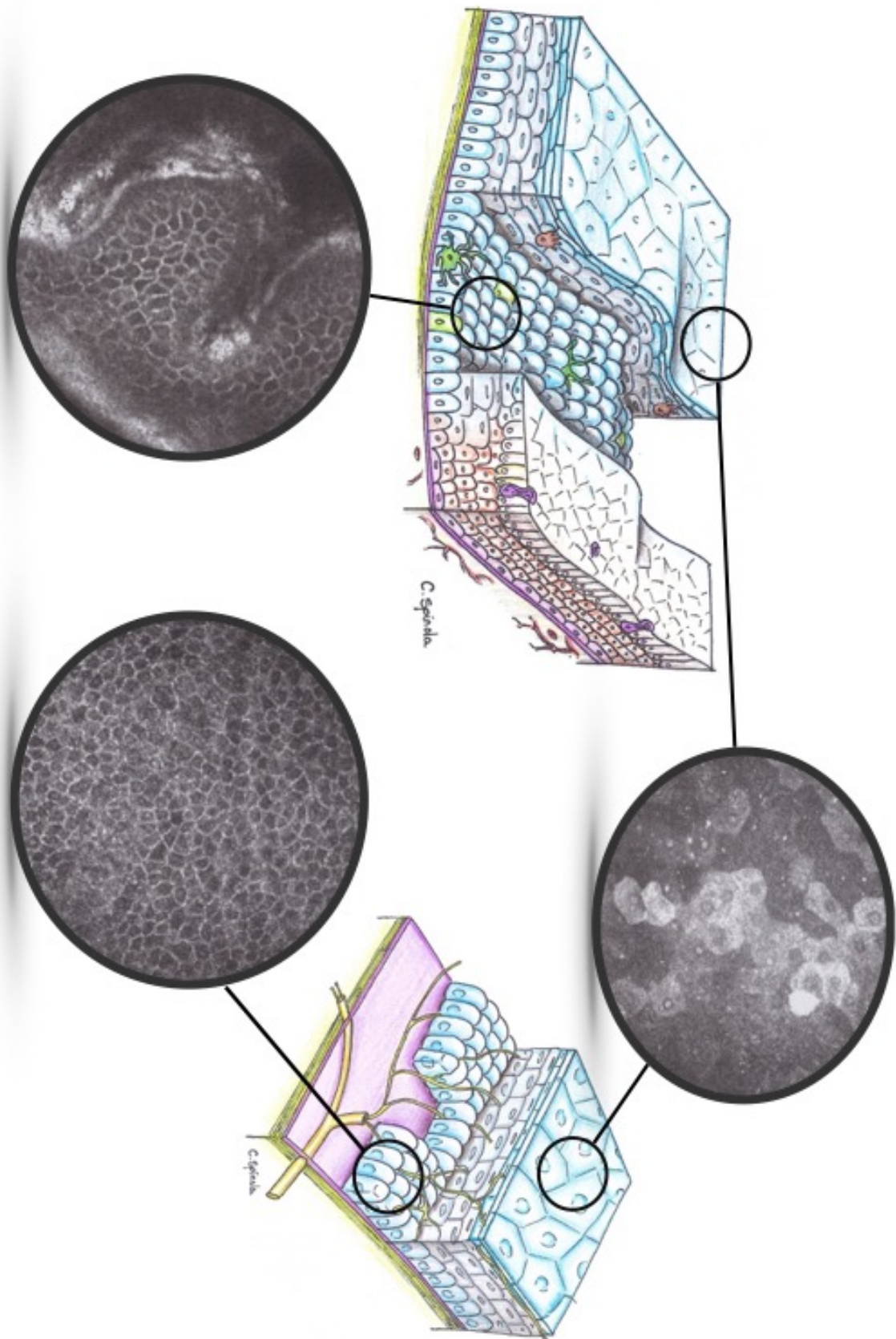
#### **I.5.6. LA SUPERFICIE OCULAR VISTA DESDE UN MICROSCOPIO CONFOCAL**

Las distintas capas del epitelio corneal son claramente visibles con el Microscopio confocal (**figura 8**). Las *células superficiales* se ven como células poligonales de bordes brillantes y núcleo oscuro totalmente distinguible del citoplasma. Tienen una densidad de aproximadamente 850 células/mm<sup>2</sup>. Las *células alares o intermedias* se observan con bordes brillantes y citoplasma oscuro siendo muy difícil distinguir su núcleo. Son más homogéneas, de menor tamaño que las células superficiales y están más compactadas con una densidad de aproximadamente 5000 células/mm<sup>2</sup> en ápex corneal. Las células basales del epitelio corneal presentan bordes brillantes y el núcleo no es visible. Al igual que las alares son muy homogéneas en tamaño y no tanto en el brillo de su citoplasma que puede variar de unas a otras. Su densidad en el ápex corneal es aproximadamente de 9000 células/mm<sup>2</sup> (**tabla 1**). La relación entre estas tres densidades celulares en córneas sanas es de 1:5:10 en el orden descrito. El plexo neural subasal es visible con la microscopía confocal, se sitúa debajo de la Bowman y la atraviesa para irradiarse por las distintas capas epiteliales corneales. Estas fibras nerviosas, amielínicas de entre 0,2-10 micras, son ramas del nervio oftálmico, nervio sensorial dependiente del trigémino.

Marlen Parissi describió en 2013, una densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal en personas sanas de 19000 (4500)<sup>3</sup>  $\mu\text{m}/\text{mm}^2$  en una muestra de 207 ojos en 106 personas sanas. Esta autora puntualiza que la densidad de nervios en  $\mu\text{m}/\text{mm}^2$  o  $\text{mm}/\text{mm}^2$ , definida como longitud total de nervio de todos los nervios subasales visibles en imágenes

---

<sup>3</sup> Media (Desviación estándar)



**FIGURA 8. MICROSCOPIA CONFOCAL DEL EPITELIO CORNEAL Y LIMBAR.**



in vivo por unidad de área, es el parámetro más “maduro”(sic) para el análisis cuantitativo del plexo nervioso subasal corneal(94).

La densidad celular, pero sobretodo, la densidad neural, es diferente según el microscopio confocal usado. Tanto los denominados *tandem scanning confocal microscope* (TSCM) como los *slit-scanning confocal microscope* (SSCM) tienen menos contraste para visualizar los nervios finos y además, en el borde de la imagen pierden más contraste aún, por lo que los recuentos son mucho mas bajos con respecto a los *laser scanning confocal microscope* (LSCM), como vemos en la **tabla 1 y 3**(87, 95). En la **tabla 3** se han recogido todos los artículos sobre densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal en pacientes sanos con microscopía confocal realizada con LSCM, en su totalidad con HRT II o III y el módulo Rostock(RCM)(94, 96-98). Junto con éstos, se han puesto a modo de ejemplo varios estudios usando otro tipo de microscopio confocal (TSCM o SSCM)(99-101). En la **tabla 1**, se realiza del mismo modo con respecto a la densidad celular del epitelio corneal, tanto con LSCM(78, 97, 98, 102) como con otro tipo de microscopios (100, 103, 104).

En la **tabla 2**, se recogen los datos mostrados en todos los artículos, en nuestro conocimiento, que realizan recuento celular y de plexo nervioso subasal corneal en insuficiencia de limbo (78, 98, 105). Hay que especificar que en el trabajo de Deng (78) describen la densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal en nervios/mm<sup>2</sup> y no en mm/mm<sup>2</sup> o µm/mm<sup>2</sup>. Se incluyó debido a que la literatura sobre la densidad de nervios en IL es escasa y no creíamos conveniente perder esta información.

Deng en 2012 propuso una nueva clasificación de la IL basada en la microscopía confocal con el módulo corneal Rostock, informando que en el estadio inicial puede ser muy útil debido a que en este estadio los hallazgos clínicos son escasos y pueden pasar desapercibidos. En concreto, se encontró que en pacientes con IL en estadios iniciales

existía una reducción de densidad de células basales del epitelio corneal de un 38 % con respecto a los controles y una reducción llamativa de un 58 % e la densidad de los nervios subasales(78). Se conoce la relación que hay entre la células basales del epitelio corneal y los nervios subasales corneales por la cual, mediante factores tróficos como neuropéptidos y neurotransmisores estimulan el crecimiento, proliferación, regeneración, diferenciación y posiblemente la migración celular(106). De hecho se sabe que existe efecto recíproco entre dichos factores tróficos, por el cual mantienen el buen estado del epitelio corneal y éste a su vez secreta factores de crecimiento neural que mantienen dichos plexos nerviosos(107). Por el contrario, la conjuntivalización es un fenómeno tardío por lo que la detección de células caliciformes en la IL es un hallazgo que encontraremos en grados avanzados e intermedios de IL(78).

### **I.5.7. NERVIOS CORNEALES: UN NUEVO MUNDO POR DESCUBRIR**

La córnea sana es el tejido más densamente innervado del organismo, varios cientos de veces mayor que la piel(108). Esto tiene una clara justificación que es la protección de un órgano tan importante como es el ojo, del que dependemos, sobremanera, para nuestra relación con el exterior. Por ello, el más mínimo estímulo en la córnea es detectado para ejecutar mediante un circuito neuronal, el cierre parpebral. Por otro lado los nervios corneales juegan un papel importante en la regulación de la integridad epitelial y la curación tras agresiones. Esta innervación corneal corre a cargo de terminaciones amielínicas en la zona distal pertenecientes al nervio oftálmico, una división del trigémino. El grosor de éstos va desde las 10  $\mu\text{m}$  a 0,2 $\mu\text{m}$ . Estos nervios corneales mientras discurren por la córnea pueden mantener uniones entre los distintos ramos que discurren paralelamente en forma de “T” o de “Y”. Los troncos nerviosos entran radialmente desde la zona limbar haciendo un

recorrido en estroma anterior y medio hasta que giran abruptamente 90° penetrando en epitelio(109). Según Guthoff existen tres patrones nerviosos(109) (**figura 3 y 9**):

- Plexo subepitelial o subasal, que discurre por debajo de la membrana de Bowman.
- Determinadas ramificaciones del plexo epitelial de forma brusca giran para penetrar en membrana de Bowman de forma directa o levemente oblicua hacia la superficie.
- Otras en cambio tras penetrar la membrana de Bowman, giran 90 grados y discurren entre las células basales hacia el centro corneal. A este se le denomina plexo epitelial basal.

La carrera para medir y analizar estos nervios corneales, en especial, los del plexo nervioso subasal o subepitelial y buscar su relación con patologías oftálmicas y no oftálmicas (v.g. diabetes mellitus) no ha hecho nada más que empezar.

En los últimos años se han analizado los nervios corneales trazándolos de forma manual y luego mediante diferentes softwares, p.ej, *Neuron J*, cuantificar longitud de nervios, densidades y ramificaciones nerviosas de una forma semiautomática. Cada vez más se están acercando a métodos y programas de análisis automático del plexo nervioso(110). Esta automatización nos trae como principal ventaja la objetividad y sobre todo, la estandarización de las medidas que nos llevaría a poder realizar estudios en los que diferentes observadores fueran aunando datos a fin de aumentar nuestro conocimiento sobre el plexo nervioso subasal corneal.

No obstante, la microscopía confocal se ha usado en los últimos 15 años para el estudio del plexo nervioso subasal corneal en ojo seco(100), queratocono(111), infecciones corneales(112, 113), usuarios de lentes de contacto(114), tras enfermedades sistémicas y determinados tratamientos(115, 116), y más recientemente ha demostrado ser más sensible

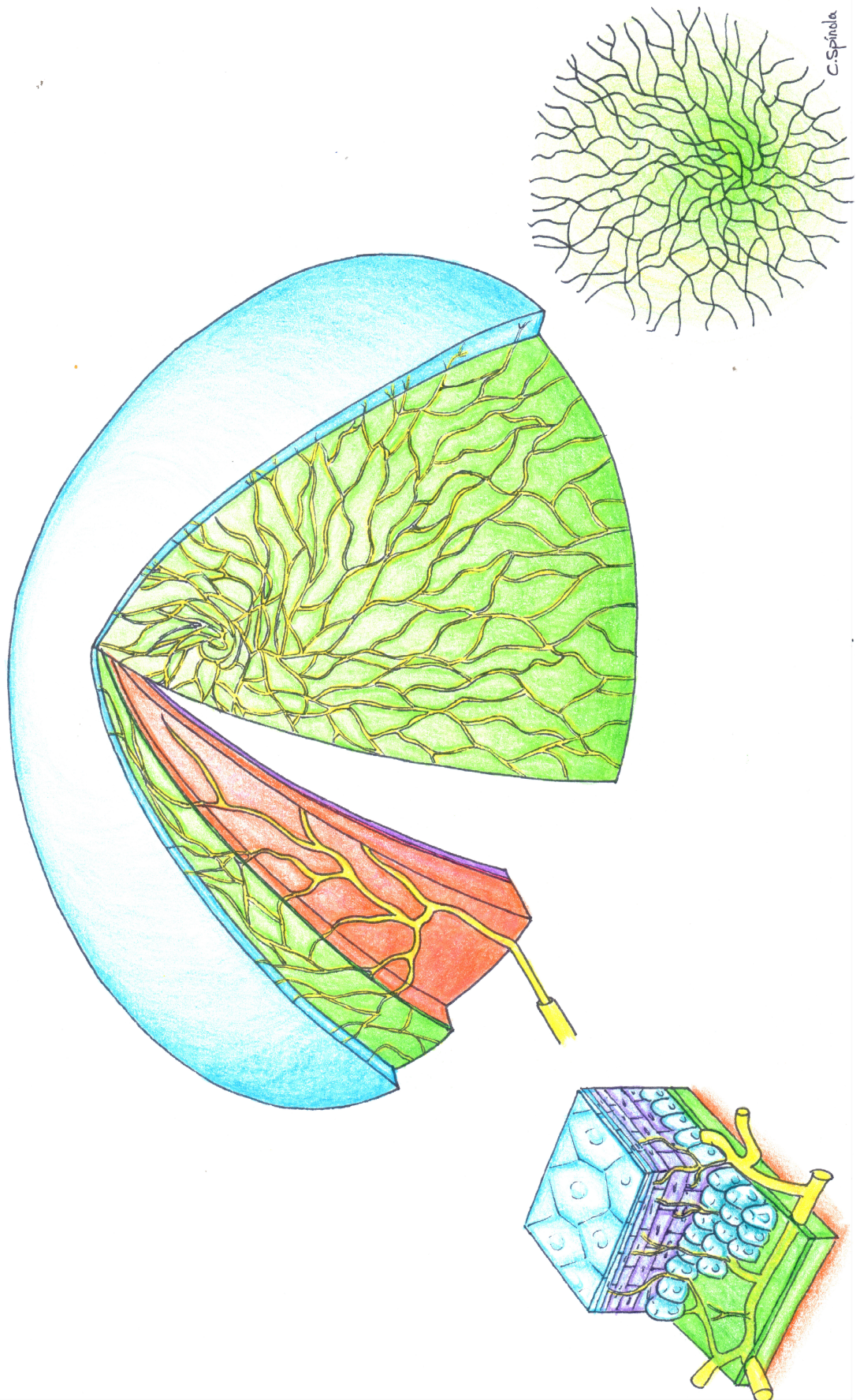


FIGURA 9. MAPA DE INERVACIÓN CORNEAL SEGÚN LOS ÚLTIMOS HALLAZGOS CON MICROSCOPIA CONFOCAL.

en detectar neuropatías periféricas por diabetes mellitus tipo 1 en estadios precoces que otras técnicas más invasivas (117).

Como muestra de la dimensión que está alcanzando el análisis de los nervios corneales fuera de la oftalmología, ya se ha descrito una correlación negativa en pacientes diabéticos entre la densidad de nervios corneales y los niveles hemoglobina glicosilada (HbA1c)(118). El equipo de Pellegrini en 2010, ya nos referían como la medida de los nervios corneales podría llevarnos a prescindir de pruebas más invasivas para estudiar la polineuropatía periférica asociada a estos pacientes, como son las biopsias y la electromiografía. Además se comentaba la posibilidad de crear indicadores precoces basados en el análisis de la densidad de nervios de la córnea en pro de proponer tratamiento también precoces, como por ejemplo, la estimulación electromagnética neural frecuencia-modulada (119). Desde 2013 están publicándose trabajos de forma más profusa relacionando los nervios corneales con la patología neurológica producida en la diabetes mellitus(116, 117, 120-122).

Recientemente se está dando cada vez más importancia no sólo a la densidad o la longitud de los nervios del plexo nervioso subasal corneal, sino a los parámetros morfológicos de éstos. Se analizan la tortuosidad, las ramificaciones y sus tipos y la longitud de la espiral inferocentral que producen de forma normal en el centro corneal (**figura 9**).

En cuanto a la longitud de los nervios por área, se considera unos de los parámetros más plausible e indicado para la detección precoz de daño neurotrófico(91). Según los tipos de microscopio confocales usados y los autores varía de entre 3,9 a 27,5 mm/mm<sup>2</sup>(91, 116, 118, 120-123), pero según la literatura revisada en este trabajo los valores de estudios con LSCM y mayor tamaño muestral lo aproximan a unos 19000 mm/mm<sup>2</sup> (4500)(94) (**tabla 3**).

La densidad de nervios se define como el número de fibras nerviosas por  $\text{mm}^2$ , aunque otros autores lo han definido como número de fibras en una imagen y otros como longitud de todos los nervios en una imagen(91, 99, 101, 124). Este último se aplica en este trabajo cuando se habla de densidad de de nervios. Para cuantificar la densidad de longitud de nervios por unidad de área, se calcula la longitud total de las fibras nerviosas en una imagen y como conocemos de antemano el área de dicha imagen que en el HRT II con RCM es de  $384 \times 384$  píxeles o  $400 \times 400 \mu\text{m}$ , obtenemos mediante una fórmula matemática dicha densidad en  $\text{mm}/\text{mm}^2$  o  $\mu\text{m}/\text{mm}^2$  según los diferentes autores. Para medir esa longitud, se usa, no sin un *tutorial* previo, el programa Image J con el plugin Neuron J (125). En diabetes, como hemos mencionado antes, la densidad de nervios se correlaciona negativamente con la HbA1c, y por tanto, positivamente, con el buen control de los niveles de glucemia, no así, la longitud de nervios por sí sola (91).

La disminución de la densidad de de nervios corneales con la edad es controvertida (99, 101). Recientes trabajos, con buenos tamaños muestrales, parecen inclinar la balanza claramente hacia el hecho de que con la edad se disminuye la densidad del plexo nervioso subasal corneal (Parissi, 207 ojos y Niederer, 85 pacientes)(94, 97). Parissi et al observaron una disminución de densidad del plexo nervioso subasal corneal de 0,25-0,30% por año y el equipo de Niederer, 0,9% por año. De hecho, Niederer et al. observaron que los queratocitos en el estroma también disminuían con la edad, pero no así, la densidad de células basales del epitelio corneal(97). Ésto es coherente con el hecho de que con la edad se ha observado que la sensibilidad corneal disminuye y el retraso en la curación de úlceras corneales aumenta(126-128). Según Niederer, si la densidad del plexo nervioso subasal corneal disminuye con la edad coherentemente junto con la sensibilidad corneal y la densidad de

células basales no lo hace, se puede decir que la disminución de la densidad de nervios corneales puede explicar el retraso en la curación de heridas corneales con la edad (97).

Respecto a la tortuosidad, es un fenómeno observado en modelos animales cuando existe regeneración nerviosa(129). En humanos, se ha descrito un incremento de ésta asociada a procesos patológicos como el queratocono, síndrome de Sjögren, síndrome de pseudoexfoliación, artritis reumatoide, severidad de la neuropatía periférica diabética y tras queratoplastia penetrante (91). Incluso, Edwards et al. crearon una escala basada en un proceso semiautomático que analiza este parámetro, designando el valor 0 a mínima tortuosidad y 1 sería la máxima (121). Con este trabajo, afirmaron que en pacientes diabéticos, la tortuosidad de los nervios corneales tenía mayor valor predictivo que la longitud de nervios. Ya se ha descrito un método automático para esta tarea que analiza los giros de estos nervios, por Scarpa et al. (130). Este método ha demostrado una buena correlación con la sensibilidad corneal obtenida con el estesiómetro de Cochet-Bonnet. Asimismo, la sensibilidad corneal se ha correlacionado de forma inversa con la densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal (117).

De hecho, al menos en pacientes con diabetes, la densidad de nervios ha demostrado ser más sensible y repetible que la medida de la tortuosidad y las ramificaciones nerviosas ya que estas últimas carecen de reproducibilidad (131). Asimismo, Rosenberg y cols. han relacionado la disminución de la densidad de los nervios corneales con el aumento de erosiones corneales y el retraso de su cicatrización en pacientes diabéticos (132). De hecho la disminución de nervios corneales ya ocurre en la polineuropatía diabética leve y moderada, no así la disminución de la sensibilidad mecánica corneal que se ve afectada sólo en grados severos de polineuropatía diabética (132). Esto nos hace suponer que la sensibilidad corneal, al menos, la mecánica, se ve afectada de forma tardía. Es sorprendente

que en el trabajo de Misra et al., se detectarían en el 50 % de los pacientes densidades anormales de plexo nervioso subasal corneal estando clasificados dichos pacientes tanto clínica como electrofisiológicamente como sanos, con respecto a la neuropatía diabética. Por ello, este trabajo postuló la densidad del plexo nervioso subasal corneal como el marcador más sensible para la neuropatía diabética(117). De hecho, 5 años antes, Tavakoli y colaboradores describieron ésta, como marcador para diagnóstico precoz y para estratificar la neuropatía diabética (133). El mismo equipo, en 2011, informó de la mejoría en la morfología nerviosa corneal cuando el control glucémico mejoraba. Este mismo hecho se ha observado en neuropatía idiopática de fibra fina en la que también se observó disminución de la densidad del plexo nervioso subasal corneal(134).

En cuanto a la retinopatía diabética y su relación con la densidad nerviosa del plexo nervioso subasal corneal hay controversia. Existen autores que confirman dicha correlación(135) mientras otros la rechazan(117, 120), aunque habría que revisar los criterios de inclusión para analizar mejor esta relación ya que para estudiar el daño neural se excluyen normalmente los pacientes que han sido tratados con fotocoagulación, siendo este un posible sesgo.

La espiral que realizan los nervios del plexo nervioso subasal corneal en la zona inferocentral corneal también ha sido estudiada por microscopía confocal (**figura 9**). Petropoulos et al. analizaron esta espiral de nervios inferocentral corneal que forma como una red capilar, obteniendo que la densidad neural en esta zona con el HRT, era de 31,5 mm/mm<sup>2</sup> (DE=7,7) o 31500  $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ . Mucho mayor que la densidad normal analizada en el centro de la córnea (19000-20000  $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ ). En este estudio se vio que en pacientes diabéticos la densidad en la zona de la espiral está disminuida(122). Se ha observado que daños corneales lejanos a este vórtice o espiral, también la afectan y de forma precoz,



observándose primero daño en las terminaciones que están dentro de esta espiral que las fibras de fuera. Patel et al. descubrieron que el plexo nervioso subasal corneal no está estático, sino en una migración centripeta continua (136). De hecho, este grupo de trabajo fueron los primeros en describir imágenes reconstruidas de campo amplio formando una sola imagen de la distribución nerviosa del plexo nervioso subasal corneal de toda la córnea(96). Posteriormente otros grupos de trabajo se han incorporado con distintos sistemas de fijación en la mayoría proyectados en monitores a distintas distancias entre los 70 cm a 1 metro y medio(137-139). La última novedad, descrita por Turuwhenua, es un software que ensambla las imágenes cual *puzzle*, *conllevando dicho* dicho procesamiento de las imágenes unas 3 horas(140). Recientemente Allgeier y colaboradores, han descrito una pantalla pequeña usada para fijación en frente del ojo no explorado de 640 por 480 pixeles en donde un punto blanco era mostrado para ir dirigiendo la mirada del paciente(141). Es en este modelo donde nos basamos para crear nuestra propia pantalla de fijación.

Por otro lado existe una relación ya descrita entre la neovascularización y la inervación corneal sensitiva. No es casualidad que siendo la córnea sana el tejido del organismo más densamente innervado del organismo también sea avascular. Se ha demostrado experimentalmente en ratones que cuando hay una denervación (electrolisis estereotáctica trigeminal, con ausencia demostrada por confocal de nervios corneales) los neovasos aparecen sólo 7 días después. Incluso se comprobó, que si se estimula la neovascularización (con dispositivos de FGF intracorneales) en una determinada zona, el plexo nervioso corneal desaparece en esa zona, no así en las zonas corneales donde no hay dichos neovasos(108). Esto nos lleva a pensar en la relación, posiblemente, a través de mediadores químicos que llevan a estas reacciones. De hecho, Ferrari y colaboradores en este estudio observaron que la inhibición mutua entre nervios y vasos era mediada por una

alteración en los angiostáticos PEDF y VEGFR3. Existía una disminución estadísticamente significativa en los niveles de estos dos angiostáticos en las córneas denervadas. No obstante, ya se había descrito anteriormente la relación entre la privación neural y la angiogénesis en el ojo en modelos experimentales, pero no con los nervios sensoriales corneales. Steinle y col. demostraron la aparición de neovascularización en retina y coroides en ratas en las que se les había realizado una simpatectomía(142). Basu et al. demostraron un aumento de vascularización en tumores malignos en ratones en los que se les había ablacionado los nervios periféricos dopaminérgicos(143).

Conocer más sobre dichos mediadores abre una puerta hacia el tratamiento de la neovascularización corneal y por ende, a la patología corneal de origen neurotrófico. Entre los factores angiogénicos se conocen Angiogenina, FGF(*fibroblast growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*), VEGF(*vascular endothelial growth factor*), entre muchos otros. Entre los angiostáticos: Angiostatina, endostatina, receptores VEGF, PEDF(*pigment epithelium-derived factor*), trombospondina 1 y 2, etc(108). Por otro lado, se ha descrito recientemente de forma experimental en modelos animales, que la avascularidad corneal depende de la alta expresión del receptor soluble de VEGF, s-VEGFR-1 o sFlt-1(*fms-like tyrosine kinase 1*). Cuando hay una herida corneal o aparece una vascularización corneal *de novo* disminuyen los niveles de sVEGFR-1 en la córnea. De otro lado, la ausencia de tejido linfático en la córnea (“*alymphaticity*”) es mediada por la presencia de SVEGFR-2 y sVEGFR-3(144).

No hay que olvidar que la córnea al estar tan ricamente innervada, ser avascular, externa y accesible a métodos diagnósticos como la microscopía confocal nos permite estudiar la relación entre los nervios y los vasos de forma poco invasiva, siendo el limbo la zona crítica de separación entre la zona corneal avascular y la zona vascular(conjuntiva). Es

bien conocido el hecho de que el estado avascular de la córnea es debido al suministro constante de sustancias angiostáticas producidas por el epitelio corneal y a que el limbo junto con la particular ultraestructura del colágeno corneal impiden la neovascularización (108). Por otra parte, se sabe que mientras algunos nervios periféricos segregan angiogénicos como el NGF (nerve growth factor)(145), otros segregan angiostáticos como el PEDF(146).

En cuanto a la relación entre la densidad de células dendríticas y los nervios corneales también se ha visto su correlación inversa en queratitis infecciosas. A medida que aumenta la densidad de células dendríticas disminuyó de forma estadísticamente significativa y con respecto a controles tanto la densidad de nervios, ramificaciones, troncos nerviosos y número de nervios totales. Hubo un claro aumento de células dendríticas en queratitis infecciosas con respecto a los controles, de mayor a menor, en queratitis por *acanthamoeba*, por hongos y por último, por bacterias(147). A pesar de esa pérdida en el plexo nervioso corneal tras queratitis infecciosas, se ha demostrado que durante los 6 meses siguientes a la fase aguda de la infección, existe una regeneración nerviosa que nunca llegará a valores de normalidad (148).

### **1.5.8. TECNOLOGÍA 3D CONFOCAL MICROSCOPY THROUGH-FOCUSING (CMTF)**

Esta técnica se desarrolló para los microscopios confocales SSCM por Jester et al. para recoger y cuantificar información 3D de la córnea. Esta técnica está basada en la diferente intensidad de reflectancia de las distintas capas corneales. Se obtienen imágenes a velocidad constante desde epitelio al endotelio. Debido a que se requiere una velocidad constante hacía imposible realizarlo con el microscopio confocal HRT que usa un tornillo que regula de forma manual el enfoque de imágenes. Recientemente se ha solucionado este

problema con modificaciones tanto del hardware como del software. El tornillo regulador se ha sustituido por una pieza motorizada Newport TRA25CC Motorized Actuator con DC Servo Motor. El anterior software sólo permitía realizar secuencias de 100 imágenes. El actual software alcanza un máximo de 14.525 imágenes. Dichas imágenes junto con la información sobre la distancia a la que se tomó (distancia = velocidad x tiempo) es compactada en un archivo “.vol”. El programa CMTF nos da una curva característica con tres picos: epitelio, capa de Bowman y endotelio. Además nos da imágenes de cortes en dos dimensiones y reconstrucciones en 3D(91).

### **I.5.9. OTRAS APLICACIONES EN OFTALMOLOGÍA**

En córneas normales se han analizado tanto la morfología y densidades celulares del epitelio, estroma y endotelio corneales, como densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal. La capa de Bowman es difícilmente reconocible salvo si se ven las estructuras “k”, que son estructuras polimórficas de material fibrilar. Además de lo mencionado, se pueden distinguir leucocitos, eritrocitos y células dendríticas o de Langerhans.

En infecciones bacterianas no se puede diferenciar el patógeno pero si células inflamatorias. Las infecciones víricas se distinguen por un patrón aberrante del plexo nervioso y abundantes células dendríticas. En la infección por *acanthamoeba*, la microscopía confocal ha demostrado una correlación con la PCR del 77%(112) y una sensibilidad del 100% y una especificidad del 84%(113), aunque en nuestra experiencia estos valores son más bajos y dependientes del estado de evolución y de los tratamientos previos. En las queratitis fúngicas, sobre todo en los hongos que presentan hifas como el *Fusarium solani* o pseudofilamentos, como la *candida*, consigue una sensibilidad del 94% y una especificidad de 78 %(113). Teniendo en cuenta que las queratitis fúngicas tienen poco rendimiento -de un

25 % aproximadamente de resultados positivos en la segunda semana- tanto en cultivos de raspado corneal, como en PCR, la microscopía confocal se presenta como una ayuda para la orientación diagnóstica y por lo tanto, el comienzo del tratamiento adecuado en estas infecciones(149).

La microscopía confocal ha sido ampliamente utilizada en el estudio de la toxicidad de los conservantes usados en los tratamientos oculares tópicos (150) y además, en el estudio de los efectos nocivos de la mitomicina C al 0,02% en la cirugía del pterigium(151).

Se han estudiado ampliamente las córneas de los portadores de lentes de contacto observándose entre otros hallazgos, cambios morfológicos de todas las capas epiteliales y aumento de células dendríticas en córnea central y periférica(109, 152, 153).

En el *cross-linking* se ha observado el efecto fotopolimerizador(154), la disminución de queratocitos en fases precoces, queratocitos activados y repoblación de éstos a los seis meses(155). No se observaron cambios en el endotelio ni cuantitativa ni cualitativamente (149, 156).

En cirugía refractiva se han estudiado los cambios en la córnea producidos tras PRK y LASIK. Se ha observado disminución de queratocitos en la zona del lentículo hasta tres años después de la cirugía(149). La reinervación corneal central total ocurre hasta dos años después de la cirugía, aunque comienza entre primer y el sexto mes(149, 157).

La ampolla de filtración en la cirugía filtrante del glaucoma también ha sido objeto de estudio por parte de la microscopía confocal(158).

**I.5.10. USOS NO OFTALMOLÓGICOS DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL**

Su uso también se ha extendido fuera de la oftalmología, y debido a que su límite en la profundidad del tejido a estudiar es de 500 micras, se ha usado en dermatología, la cavidad oral, cérvix uterino y tracto gastrointestinal(149).

Uno de los usos más extendidos fuera de la oftalmología es en el campo de la dermatología, usándose para ésta indicación un tipo de microscopio especial para dermatología denominado Vivascope 3000 (Caliber, rochester, New York; USA, distribuido en Europa por MAVIG GmbH, Munich, Alemania)(159). Podemos ver la epidermis hasta una profundidad de 200  $\mu\text{m}$  como una capa avascular de epitelio escamoso con inervaciones mielinizadas y no mielinizadas con características terminaciones que penetran en epitelio aportando la sensibilidad cutánea denominadas *telodendras*(109).

Este mismo microscopio para uso dermatológico se ha usado en tumores de conjuntiva y del borde parpebral, aunque el microscopio confocal usado en oftalmología es el que se ha utilizado clásicamente para dichos tumores (160).

En cavidad oral y lengua su uso principal es en el diagnóstico diferencial de lesiones precancerosas. Se han detectado criterios de malignidad en su epitelio: núcleos alargados, aumento de tamaño celular con polimorfismos, aumento del ratio núcleo/citoplasma, agrupaciones celulares, pérdida de la arquitectura normal y de las uniones celulares que se detectan al no visualizarse la membrana celular(109).

También se está usando para detectar problemas dentales en el esmalte, desmineralización dental y problemas gingivales(109).

Dentro de la aplicaciones experimentales de la microscopía confocal, se encuentra los estudios animales, realizados en conejos ratas y ratones, y la reconstrucción en 3D de la córnea (91, 149).

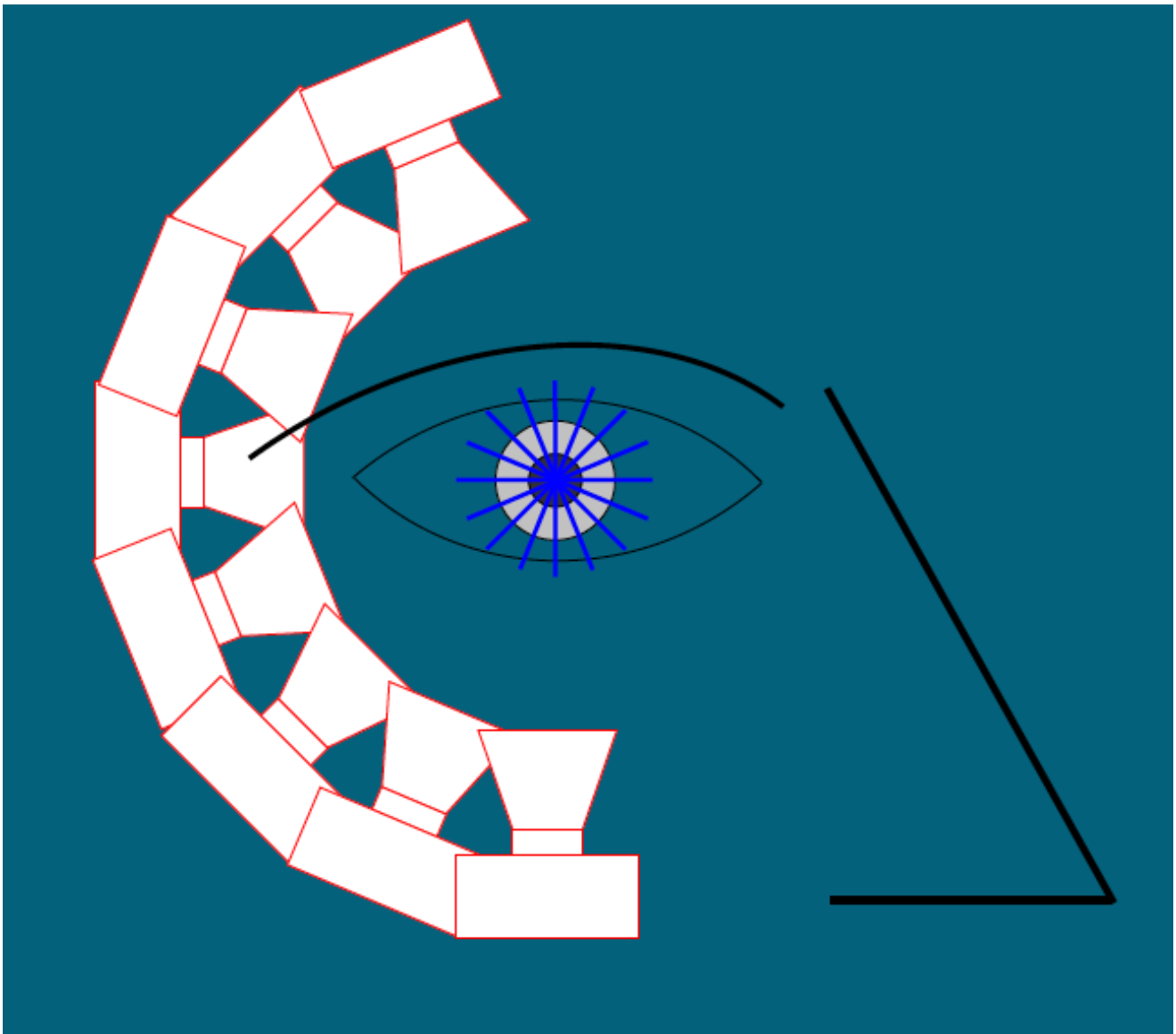
La innovadora tecnología multifotón nos abre las puertas a un nuevo campo en el que evita algunas de las limitaciones de la microscopía confocal por lo que será una nueva línea de investigación (149, 161).

## **I.6. PENTACAM**

Pentacam® es un analizador de cámara anterior y córnea que mediante una cámara Scheimpflug rotacional obtiene imágenes tridimensionales de alta resolución del polo anterior del ojo. Mediante el software de que dispone, reconstruye la córnea obteniendo curvatura anterior, posterior, y parte de las estructuras de la cámara anterior, inclusive parte del cristalino. Para realizar esto, obtiene hasta 50 imágenes en 2 segundos sin contactar con el ojo, desde la superficie anterior de la córnea hasta la superficie posterior del cristalino (**figura 10**). Cualquier movimiento del ojo es detectado por una segunda cámara y corregido durante el proceso. Posteriormente, calcula un modelo tridimensional del segmento anterior del ojo a partir de los 25.000 puntos de elevación real. Las imágenes de Scheimpflug que se han capturado se digitalizan en la unidad central y son transferidas a la computadora personal. Al finalizar la captura, mediante el software facilitado se calcula un modelo virtual en 3 dimensiones del segmento anterior del ojo a partir del cual se genera toda la información adicional. El sistema permite, entre otras funciones, magnificar las imágenes, compararlas, realizar mediciones manualmente, ajustar el contraste o animar la imagen en tres dimensiones. Se presenta la topografía y paquimetría de la totalidad de la superficie anterior y posterior de la córnea de limbo a limbo. El análisis de la cámara anterior del ojo incluye el cálculo del ángulo, volumen y profundidad de la cámara anterior; así como una función de medida manual de cualquier punto de la cámara anterior. También se genera la densitometría de córnea y cristalino. Por otra parte, Pentacam® dispone de un aberrómetro de Hartmann-Shack que analiza las aberraciones y nos informa de ellas ordenándolas según el polinomio de Zernike.

Hay que tener en cuenta que la diferencia entre la topografía con discos de Plácido (usada por ejemplo en el Keratograph) y la tomografía (del griego: *tomo*, corte y *graphéin*,





**FIGURA 10. ILUSTRACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DE UNA CÁMARA DE SCHEIMPFLUG.**

registrar) es que la topografía mide la superficie de la córnea mientras que la tomografía mide sus espesores en tres dimensiones. Esto es, realiza y analiza un modelo 3D de la córnea reconstruido a partir de puntos reales.

#### **I.6.1.APLICACIONES DEL PENTACAM® EN PATOLOGÍA CORNEAL**

Aunque las aplicaciones son muy amplias en la práctica clínica diaria, en la patología y cirugía corneal, en la selección de casos y seguimiento de cirugía refractiva, en cataratas,

en implantes de lentes intraoculares y en glaucoma, nos centraremos en las aplicaciones en córnea.

Uno de sus usos más frecuentes es en la valoración oftalmológica previa al LASIK, siendo el estudio del espesor corneal uno de los datos más importantes. Pentacam® captura la paquimetría en 25.000 puntos, destacando el centro pupilar, el ápex, el punto de menor espesor corneal, y su desviación al ápex, aunque se puede conocer el espesor corneal en cualquier punto manualmente sobre la pantalla. Esto ayudará, por ejemplo, a diferenciar un moldeado corneal de un queratocono, pues en el caso del moldeado no se observa adelgazamiento en el área del encorvamiento de la cara anterior corneal. El mapa paquimétrico se deduce de las diferencias entre la cara anterior y posterior de la córnea; por tanto, es independiente del plano de referencia sobre el que se realizan los mapas de elevación. La progresión del mapa paquimétrico es útil en la detección de ectasias corneales(162). Al disponer del espesor corneal o paquimetría junto a la curvatura anterior y posterior, reconstruye un modelo tridimensional que nos da el volumen de corneal y de la cámara anterior.

Pentacam® dispone de un programa destinado a la detección de queratoconos que consta de dos partes. La primera es para la detección de queratoconos y su clasificación basándose en la superficie anterior corneal y en una serie de índices. La segunda, denominada análisis de la estabilidad corneal, se fundamenta en el estudio de los datos paquimétricos corneales ordenados en anillos concéntricos alrededor del punto de menor espesor. Estudia la variación del espesor corneal desde el punto más fino hacia la periferia, con lo que puede darnos el punto de menor grosor corneal.

Las mediciones obtenidas de la superficie corneal (curvatura, elevación, análisis de Fourier y de Zernike) se aplican para obtener una serie de 8 índices. Dichos índices

corneales permiten que la multitud de datos tomados por Pentacam® se puedan resumir en valores numéricos que establecen propiedades concretas de la morfología de la superficie corneal. Estos valores de los índices de cada córnea se combinan, y permiten realizar una clasificación de la morfología corneal y de un posible queratocono, clasificándola en grados desde el 1 al 4, clasificación adaptada de la de Amsler y Muckenhirn.

El análisis de la estabilidad corneal aporta una gráfica y una serie de índices que representan el aumento del espesor corneal desde la localización más fina de la córnea hacia la periferia en anillos concéntricos. Esta progresión (Q :asfericidad) es más homogénea en córneas sanas que en queratoconos, en los cuales el aumento de dicho espesor corneal hacia la periferia es más pronunciado (**figura 11, tabla 4**).

Otras aplicaciones en pacientes operados con láser excímer son: detectar ectasias corneales postquirúrgicas, evaluar la opacidad corneal, así como las estrías corneales o la interfase tras LASIK.

Pentacam® es útil para comprobar la correcta localización de los anillos intracorneales implantados, que habitualmente se realiza al 75-80% del espesor corneal; así como para estudiar la cara anterior y posterior de la córnea antes y después de la intervención.

En queratoplastias lamelares, se pueden identificar relaciones entre los síntomas del paciente y cualquier irregularidad corneal que afecta a la interfase entre tejido donante y tejido receptor. Además, los mapas de elevación posterior pueden aportar información acerca de las propiedades de la córnea posterior. Las imágenes Scheimpflug permiten localizar áreas de opacidad y problemas en la interfase. En queratoplastias penetrantes se puede observar la línea de unión entre córnea donante y receptora, así como cualquier

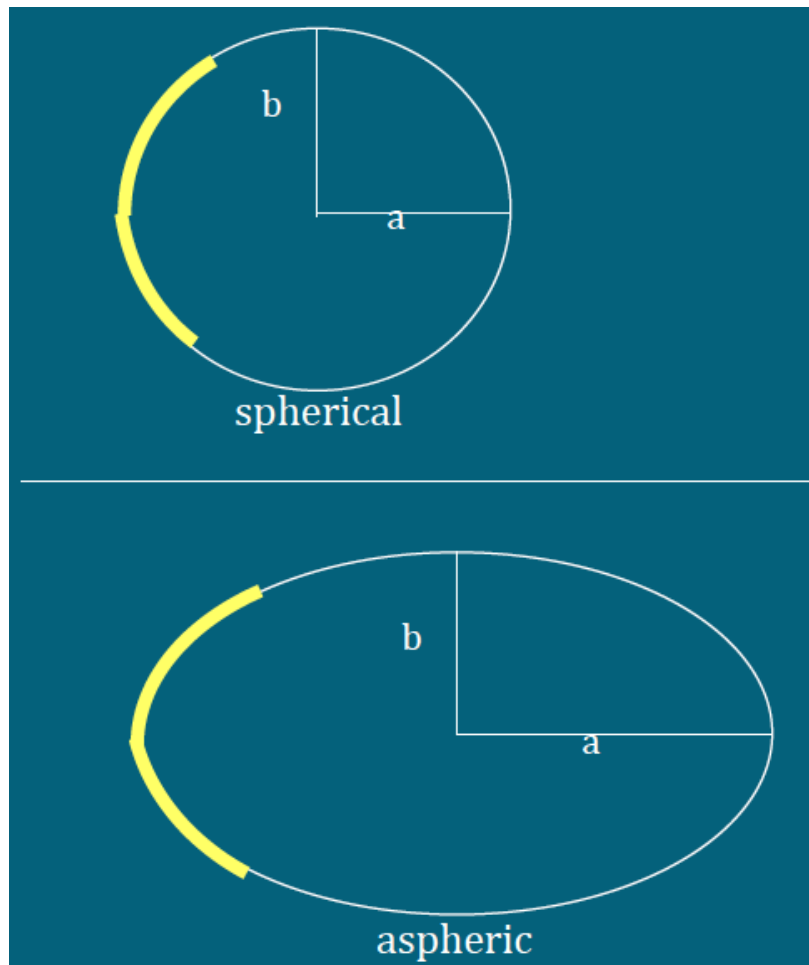


FIGURA 11. ESFERICIDAD Y ASFERICIDAD.

Tabla 4. Valores de Q (Asfericidad)

ASFERICIDAD (Q)	FORMA	DESCRIPCIÓN	EJEMPLO
$>0$	OBLATA	Encorvamiento periférico	Queratotomía radial
0	ESFÉRICA	Curvatura uniforme	Esfera de calibración
$<0$	PROLATA	Aplanamiento periférico	
-0,26	PROLATA	Aplanamiento periférico moderado	Córnea normal
$<-0,26$	HIPERPROLATA	Aplanamiento periférico marcado	Queratocono

adelgazamiento corneal producido por imperfecta alineación entre ambos tejidos. Los mapas topográficos que genera el Pentacam® son de hasta 12 mm de diámetro, mientras que los de los topógrafos basados en discos de Plácido son de 9-10 mm, lo cual es útil a la hora de valorar la retirada de suturas(162).

Es una herramienta útil para objetivar la progresión de patologías como, por ejemplo, la enfermedad de Terrien; para valorar la evolución tras las queratotomías arcuatas; para medición de leucomas en córnea; o valoración de defectos corneales tras la extracción de cuerpos extraños(162).

Una de las aplicaciones del Pentacam® es que realiza la medición de las aberraciones corneales mediante el aberrómetro de Hartmann-Shack. Una aberración no es más que la desviación de un frente de onda cuando pasa por un sistema óptico respecto a un sistema óptico de referencia. Se mide en micras y se organiza en polinomios de Zernike. Los polinomios de Zernike son funciones trigonométricas independientes que son apropiadas para describir las aberraciones del frente de ondas debido a su ortogonalidad.

Existen dos tipos de aberraciones: las de alto orden (*High Order Aberrations, HOA*) y las de bajo orden(*Low Order Aberrations, LOA*). Ambas se miden de forma promediada con el RMS (*Root Mean Square*) o media cuadrática. La RMS es una medida estadística de una magnitud, en este caso las aberraciones, que consiste en la raíz cuadrada de la media aritmética de los cuadrados de los valores. Las aberraciones que incluye el Pentacam® en las de bajo orden(LOA) son las de primer y segundo orden, siendo las de alto orden (HOA) las de tercer orden y siguientes hasta un máximo de 8º orden. Las únicas aberraciones que se pueden corregir con gafas son las de segundo orden. Además se puede modificar el diámetro que se quiere analizar hasta un máximo de 10 mm en el Pentacam.

Las aberraciones de bajo orden, como el desenfoque y el astigmatismo, son las que más afectan a la imagen retiniana final. Por otro lado, las de alto orden, tales como la aberración esférica y el coma, también afectan a dicha imagen. Estas últimas fueron descritas por primera vez por Smirnov en 1961 mediante un test psicofísico, aunque la primera vez que se midieron objetivamente fue con un sensor de Hatmann-Shack en 1994. Estas aberraciones de alto orden, relacionadas con el astigmatismo irregular, fueron motivo de estudio debido al deseo de corregirlas sobretodo en el auge de la cirugía refractiva(163).

Una de las aplicaciones devenida de medir las aberraciones de alto orden ha sido clasificar la severidad de los queratoconos en la clasificación de McMahon, denominada *Keratoconus Severity Score* (KSS) (164).

## **I.7. KERATOGRAPH 5M**

El Keratograph 5M (K5M, Oculus, Wetslar, Alemania) utiliza un disco de Plácido y también un queratómetro integrado en la medición de la topografía de la superficie anterior corneal. El disco descrito por el oftalmólogo portugués Antonio Plácido da Costa en 1880(165), consta de un hemisferio retroiluminado con miras alternantes blancas y negras. El paciente mira dentro de este hemisferio a un punto de fijación iluminado dentro de los anillos concéntricos. Este patrón de anillos concéntricos se proyecta sobre la película lagrimal de la superficie anterior de la córnea. La córnea actúa como un espejo y refleja el patrón proyectado hacia una cámara, que está situada en el centro del dispositivo y recoge imágenes de dicha proyección. Además, el queratómetro integrado realiza una medición automática que garantiza reproducibilidad muy alta en los resultados. El software del que dispone, calcula la topografía de la córnea basándose en los datos medidos. Además dispone de luces tipo led de distinto color para analizar distintas magnitudes(**figura 13**). Dentro de las aplicaciones de la que consta están:



**FIGURA 12. KERATOGRAPH 5M**

1. Topografía corneal con discos de Plácido.
  2. Análisis de Fourier, Zernike y clasificación de queratocono(Amsler-Muckenhirn).
  3. Adaptación de Lentes de contacto con fluorograma y el software Oximap©.
- 3.1. Adaptación de lentes de contacto:

3.1.1. Selecciona automáticamente la mejor adaptación matemática de lentes de contacto (el K5M contiene una “librería” de todas las lentes de contacto, constantes, adaptaciones y mapas de oxigenación).

3.1.2. Calcula la excentricidad y la curvatura sagital.

3.1.3. Nos aporta la fluo-imagen.

3.1.4. La potencia de la lente de contacto se calculará basándose en la expectativa de refracción.

3.2. Oximap©. Visualización de la transmisibilidad de oxígeno de las lentes de contacto blandas. La transmisibilidad o la permeabilidad del oxígeno dependen de:

3.2.1. El material (esto es una constante [Dk]).

3.2.2. El espesor de la lente [t].

3.2.3. La posición de la lente de contacto.

#### 4. Oculus TF-Scan.

4.1. Altura del menisco lagrimal (*tear meniscum height, TMH*). La altura del menisco lagrimal se puede medir con precisión con ayuda de la regla de medición integrada y de diversas opciones de ampliación, además de poder valorarse cómo discurre a lo largo del borde del párpado inferior. Así, se puede analizar la ptosis parpebral inferior, lagofthalmos, síndrome del párpado flácido o *floppy* parpebral y la conjuntivochalasis. El resultado se almacena en el archivo del paciente, por lo que aporta la ventaja de ser una prueba documentable. Valores por debajo de 0,2 mm se consideran sospechosos. Entre 0,2-0,4 mm se considera normal. Aunque estos valores son aportados por la casa comercial



(Oculus), Tung et al. informan de un menisco lagrimal normal de 0,35(DE 0,18) mm (166).

4.2. NIK BUT (Non Invasive Keratograph Break-Up Time). Es el tiempo de ruptura lagrimal pero realizado de forma no invasiva y objetiva según el análisis de la disrupción del reflejo de los anillos de plácido en la película lagrimal. El keratograph 5M® nos aporta varias medidas de este parámetro: NIK BUT primero, NIK BUT medio y el nivel de ojo seco según el NIK BUT. Los valores de referencia son:

- Estable: NIK BUT primero  $\geq 10$  segundos; NIK BUT medio  $\geq 14$  segundos.
- Sospechoso: NIK BUT primero: entre 6 y 9 segundos; NIK BUT medio: entre 8 a 13 segundos.
- Anormal: NIK BUT primero  $\leq 5$  segundos; NIK BUT medio:  $\leq 7$  segundos.
- Si es  $\leq 1,5$  segundos se declara como “tiempo demasiado corto”.

El TBUT(*tear break-up time*) sigue siendo el test más usado para determinar la estabilidad lagrimal (167, 168) ya que es útil tanto en diagnóstico como en el manejo del tratamiento del ojo seco (169, 170).

El TBUT o tiempo de ruptura lagrimal mide lo mismo que el NIK BUT pero de formas diferentes. Ambos miden la estabilidad del film lagrimal. El TBUT fue originariamente descrito por Norn en 1969 y posteriormente Lemp y Holly lo definieron y usaron para evaluar la estabilidad y la calidad de la lágrima(171), mediante la observación de la lágrima asistida por colirio de fluoresceína y luz azul. Por su parte, el NIK BUT, no es más que el NIBUT (*no invasive break up time*)

realizado por el Keratograph 5M®. El NIBUT es el tiempo de ruptura lagrimal de forma no invasiva y se realiza sin fluoresceína. Primariamente se midió con el Tearscope®(172). El Tearscope® mide la ruptura de la lágrima observando la distorsión de una imagen proyectada en la córnea cuantificando el tiempo que tarda en romperse tras un parpadeo.

Un TBUT por debajo de 10 segundos es anormal (173), y por debajo de 5 es un ojo seco, mientras que entre 5-10 es marginal o sospechoso(174). Según Goto et al., el TBUT tiene una sensibilidad y especificidad para ojo seco del 75% y 60% respectivamente(175). Por otro lado, es conocida su baja reproducibilidad, ya que esta prueba se ve influida por la experiencia del explorador, parpadeos parciales, tipo de iluminación de la lámpara de hendidura e incluso por las características del colirio de fluoresceína: volumen instilado, pH, concentración, conservantes, fluoresceína en tiras o en colirio,...(176-178). De ahí, los intentos por medir la estabilidad lagrimal de forma objetiva, reproducible y no invasiva(179).

La primera vez que se usó un topógrafo para el NIBUT en vez de un queratómetro fue con el TMS-1 (*Tomey Technology*, Cambridge, Massachussets, USA) en 1999 y se implementó cuando Goto en 2003 lanzó el software *Tear Film Stability Analysis System* (180, 181). Posteriormente Gumus et al. describió por primera vez el uso del Keratograph® de Oculus (Wetzlar, Alemania) con el software “Tear Film Scan”(TF-Scan) para este menester (182).

Hong y Best obtuvieron valores del NIKBUT mas cortos que con el TBUT clásico y con el Tearscope®, respectivamente (183, 184). Se postula que por ser un método más objetivo y sensible capta antes cualquier ruptura en la lágrima más precozmente que un observador en la lámpara de hendidura (184). Recordemos que

el Tearscope® es un método subjetivo por el que un observador en la lámpara de hendidura observa cualquier disrupción en la lágrima de la imagen proyectada por el aparato(179).

4.3. TF-lipid layer (capa lipídica de la película lagrimal). Mediante interferometría, los colores interferenciales de la capa lipídica y su estructura se vuelven visibles, lo cual permite registrarlos. A partir de su estructura y color se estima el espesor de la capa lipídica.

4.4. TF-dynamic (dinámica de la película lagrimal). Valoración del comportamiento de flujo de las partículas de la película lagrimal mediante la grabación en vídeo, a una velocidad de hasta 32 imágenes por segundo. Esto permite inferir la viscosidad de la película lagrimal y su movilidad.

5. OCULUS Meibo-Scan. Valoración de las glándulas de Meibomio tras una fotografía con luz infrarroja donde el explorador selecciona un polígono y se calcula el área de glándulas desestructuradas o desaparecidas. Si el área afectada es menor a 1/3 de la superficie analizada se le denominará grado 1. Si es mayor de 2/3, grado 3. Entre ambos caso, grado 2.

5.1. Meibografía de los párpados superior e inferior

5.2. Visualización 3D de las glándulas de Meibomio

6. OCULUS R-Scan. Hasta ahora el enrojecimiento conjuntival se valoraba de forma subjetiva y dependiente del oftalmólogo mediante diferentes escalas. Existen, en nuestro conocimiento, varias escalas, todas según comparativas con fotografías que sirven de modelo. Una es la de McMonnies y Chapman-Davies(M-CD) que clasifica de 0 a 5. Otra escala es la del *Brien Holden Vision Institute*, denominada primeramente

como IER(*Institute for Eye Research*) y luego, es más conocida como CCLRU (*Cornea and contact Lens Research Unit*) y va del 1 al 4. La de Efron es muy parecida a la anterior. La *Validated Bulbar Redness* (VBR) System usa un sistema de 100 puntos, siendo fiable, repetible y menos influida por el observador ni por la experiencia de éste. Además, es la única validada de las escalas basadas en imágenes modelo. De ésta hay dos versiones comerciales, la VBR-5 o la VBR-10 dependiendo del número de imágenes que tiene para comparar. Actualmente debido a la mejora en los sistema de captura, análisis y procesamiento de imágenes, junto con la digitalización y las potentes computadoras informáticas existen varios sistemas de análisis de hiperemia automatizados(185). Recientemente un nuevo sistema de clasificación ha sido propuesto, el Ocular Redness Index (ORI), que va de 0 a 100 puntos porcentuales y parece el más versátil y objetivo hasta la fecha(186). Con el módulo R-Scan del Keratograph 5M, el K5M es el primer aparato de venta comercial que documenta y clasifica de forma automática y objetiva el grado de hiperemia conjuntival y límbica (187). R-Scan detecta los vasos de la conjuntiva y limbo, y evalúa el grado de hiperemia. Con esta objetividad abre un nuevo campo en la investigación y valoración de la hiperemia ocular como signo crítico en la oftalmología, sobretodo en el segmento anterior. Mide el enrojecimiento -así se denomina en el K5M la hiperemia, aunque se va a corregir en próximas mejoras- limbar temporal y nasal, enrojecimiento bulbar nasal y temporal, enrojecimiento medio bulbar y el área analizada. Está basada en la escala ORI pero transformado a escala decimal y llegando como máximo a 4 (40 % en ORI), por lo que va del 0 al 4 en escala decimal (187).

7. Imagen y video de alta resolución con luz blanca y luz azul para exploración con fluoresceína.

8. OSDI del K5M entrevistado. El cuestionario *Ocular Surface Disease Index* (OSDI) fue desarrollado por el grupo de investigación *Outcomes Group Allergan Inc.* (Irvine, California, U.S.A.), descrito en 1997 por Walt JG et al.(188) y validado por Rhett Schiffman et al. en 2000 (189) para diagnosticar cualquier tipo de ojo seco y graduar su severidad. Tuvo buenas correlaciones con las pruebas para ojo seco como el test de Schirmer, tiempo de ruptura lagrimal (TBUT) y los cuestionarios como el NEI-VFQ 25, McMonnies y el *Short Form-12 Health Status*. Aunque su diseño fue originariamente creado para el síndrome de ojo seco usándose ampliamente para ello (190-192), también se ha utilizado para valorar el efecto sobre la superficie ocular (SO) del tratamiento antiglaucomatoso(193, 194), lentes de contacto(195, 196), enfermedad distiroidea con afectación ocular (197, 198), disfunción de glándulas de meibomio(199, 200), incluso para valorar el efecto en la SO de la polución ambiental(201) y el Síndrome de apnea obstructiva del sueño (202) entre muchas otras patologías. En cuanto al síndrome de ojo seco, se ha descrito una escala de severidad basada en el OSDI, siendo normales valores inferiores o iguales a 12 puntos, de 13 a 22 grado leve, de 23 a 32 grado moderado y mayores de 33 puntos, grado severo(203).

Las ventajas que aporta el K5M en la exploración de la superficie corneal son:

- Resultados más objetivos y repetibles (puramente objetivos: NIKBUT y enrojecimiento).
- Clasificación automática de NIKBUT, OSDI y enrojecimiento.
- No invasiva.
- Rápida.

- Control y documentación de la evolución(pruebas documentables y por tanto comparables).
- Mejor comunicación con el paciente y comprensión por parte de éste con el nuevo informe JENVIS, por el cual en un sólo informe se informa en una escalas de colores verde, amarillo y rojo, el estado de las principales pruebas.

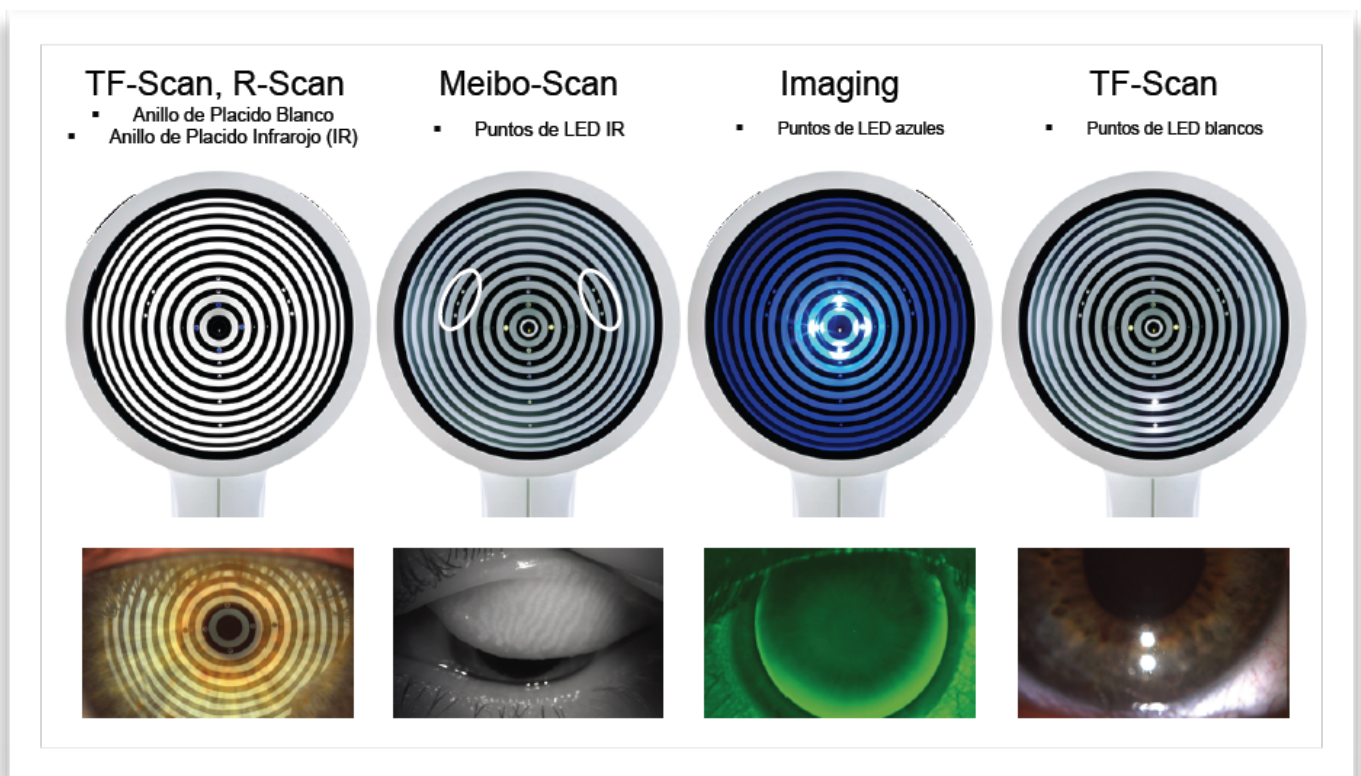


FIGURA 13. KERATOGRAPH 5M: DIFERENTES LUCES TIPO LED Y SUS APLICACIONES.

## **I.8. CLASIFICACIONES DE INSUFICIENCIA LIMBAR**

Mackman introdujo la primera clasificación para los distintos grados de IL en aniridia en 1979 (204). Tras ésta, se han realizado numerosas clasificaciones, diferenciándose en tres grupos, uno según la etiología (205-207), otro según la gravedad a través de los síntomas y signos clínicos(78, 208, 209) y otra híbrida, para pronóstico quirúrgico combinando afectación limbar, estado de la conjuntiva y etiología(210). Según la etiología, pueden ser lesiones directas sobre el limbo, de las propias células limbares o alteración del microambiente limbar o su nicho. En la tabla adjunta se expone la clasificación según etiología y su frecuencia relativa (207) (**tabla 5**).

Como comentamos, Schwartz y cols. introdujo en 2002 una clasificación híbrida en la que por una lado valoraba el estado inflamatorio de la conjuntiva y la afectación del limbo, y por otra la etiología(211). Esta clasificación tiene carácter pronóstico en el momento prequirúrgico. De tal forma que estar en un estadio inferior v.g., IA, tendrá mejor pronóstico que estar en un IIC. El estado de la conjuntiva se valora en “A” si la conjuntiva está normal, estadio “B” si se trata de una conjuntiva que ha estado inflamada previamente pero ahora no o estadio “C” si la conjuntiva está actualmente inflamada. Con respecto al limbo, lo valora en I, si la afectación es menor al cincuenta por ciento o II, si está afectado en mayor medida. Dentro de cada estadio sitúa las posibles etiologías según su mejor o peor pronóstico (**tabla 6**).

Las clasificaciones de signos y síntomas se exponen en la tabla 7: López-García(208) (2006), Paolo Rama (2010)(209), y Sophie Deng (2012)(78) (**tabla 7**). Esta última además ha desarrollado una clasificación según la microscopía confocal(78). La microscopía

Tabla 5.Causas de Insuficiencia limbar y su frecuencia relativa.

<b>Etiopatogenia</b>	<b>Factores causales</b>
Destrucción directa (56%)	
	Causticaciones o lesiones térmicas (36%)
	Conjuntivitis cicatrizantes: Penfigoide Ocular cicatricial (frecuencia desconocida), Síndrome de Stevens-Johnson(SJS, 7,5%)
	Cirugías múltiples,radiación y/o crioterapia en región limbar(4%)
	Toxicidad farmacológica
	Queratopatía por lentes de contacto (5,3%)
	Infección microbiana grave (3%)
	Queratitis periférica inflamatoria
Alteración del microambiente limbar(43 %)	
	Aniridia (14%)
	Displasias ectodérmicas
	Queratitis asociadas a deficiencias endocrinas múltiples (2%)
	Queratopatía neurotrófica (neuronal o isquémica) (14%)
	Idiopática(8,5%)

Tabla 6. Estadiaje preoperatorio de Schwartz y Holland et al.

<b>Estado de la Conjuntiva</b>			
	A: Normal	B: Previamente inflamada	C: Inflamada
Estadio I IL<1/2	Iatrogénico, CIN, QLC (Ia)	Historia de causticación o quemadura ocular (Ib)	SJS moderado, POC, Causticación o quemadura ocular reciente (Ic)
Estadio II IL>1/2	Aniridia, queratopatía por lentes de contacto severa, iatrogénica (IIa)	Historia de causticación o quemadura ocular (IIb)	SJS severo, POC, Causticación o quemadura ocular severa (IIc)
CIN:Neoplasia conjuntival, Intraepitelial, QLC; Queratopatía por lentes de contacto, SJS: Síndrome de Steven-Johnson, POC: Penfigoide ocular cicatricial			



confocal nos permite el acceso a la anatomía celular y estructural de la córnea, conjuntiva y limbo, a gran aumento, de forma no invasiva y sin tener que realizar biopsias, las cuales podrían desencadenar fenómenos inflamatorios y/o cicatriciales que es mejor evitar, por razones obvias. Además, la clasificación de Deng nos acerca más tempranamente al diagnóstico, de forma objetiva y cuantifica mucho mejor la severidad de cada caso(78). Ésto, a su vez, nos lleva a poder tratar mejor a nuestros pacientes con una escala terapéutica acorde con su severidad. Además, la microscopía confocal supone un método que aunque relativamente costoso en cuanto a su tecnología, resulta económico en cuanto al consumo de fungibles por cada prueba-test.

En la tabla 7 se exponen las principales clasificaciones. En ella falta poner un estadio final en la P. Rama, que denomina total, donde la córnea está completamente vascularizada y opacificada. En nuestro conocimiento, no encontramos un estadio leve en la clasificación de Paolo Rama, siendo el inferior, el estadio moderado(209).

Tabla 7. Clasificaciones de la Insuficiencia Limbar

RAMA (2010)		LÓPEZ GARCÍA(2006)			DENG SX(2012)	
GRADOS		Episodios de úlceras recurrentes y erosiones recidivantes	Síntomas	En lámpara de hendidura (LH) y fluoresceína	Microscopía Confocal IVCM	Signos en LH
<b>Grado 1 o leve o precoz</b>		≤2 en los últimos 6 meses	Leve fotofobia y epífora	No pannus Pannus < 1 mm Tinción leve	<ul style="list-style-type: none"> <li>Epitelio corneal</li> <li>Bordes no muy definidos</li> <li>Núcleo prominente</li> <li>Células basales, algunas con núcleo prominente, aumentadas en tamaño y en menor número</li> <li>Disminución de densidad de nervios subasales</li> </ul>	Brillo corneal apagado QPS Tinción tardía
<b>Grado 2 o moderado o intermedio</b>	Conjuntivalización menos de 180° corneales. No alcanza centro corneal.	≥3 en los últimos 6 meses	Fotofobia, epífora y ojo rojo	Pannus ± tejido fibroso subepitelial < 1/2 de periferia corneal Inestabilidad total lagrimal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Afectación capas más profundas.</li> <li>Todas las células epiteliales afectadas.</li> <li>Núcleos más prominentes y tamaños mayores celulares.</li> <li>Bordes menos definidos en basales</li> </ul>	Tinción tardía persistente En patrón de VÓRTICE con depresión epitelial
<b>Grado 3 o grave o tardío</b>	Conjuntivalización de más de 180°. La opacificación alcanza el centro. Defectos epiteliales recurrentes	Inestabilidad epitelial y lagrimal permanente	Además de lo anterior, disminución de AV	Pannus llega a centro corneal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Metaplasia en epitelio corneal</li> <li>Neovascularización</li> <li>No nervios subasales.</li> <li>Se pierde morfología típica de células alares y basales.</li> </ul>	Vórtice con Defecto Epitelial recurrente ± Neovascularización o Conjuntivalización

## **I.9. TRATAMIENTO DE LA INSUFICICENCIA DE LIMBO**

### **I.9.1. TRATAMIENTO MÉDICO Y CONSIDERACIONES PREVIAS A TRATAMIENTO QUIRÚRGICO**

Antiguamente, en el arsenal terapéutico de la IL sólo teníamos lubricantes, lentes de contacto y tarsorrafia pasando, cuando había una opacidad corneal importante, a la queratoplastia, lamelar o penetrante, de pronóstico sombrío cuando existe una IL previa. Menos del 50 % de la queratoplastias penetrantes permanecen transparentes cuando existe una IL previa(212).

Desde que conocemos la importancia del nicho limbar y de su microambiente, sabemos que sin ser éstos restablecidos cualquier proceso fracasará(213).

Dentro del tratamiento podríamos considerar varias cuestiones, primero si estamos en una fase aguda de la enfermedad ya sea un periodo agudo de una enfermedad mucosinequante o una causticación, o ya en fase establecida o crónica. El control de la inflamación es una condición *sine qua non* antes de cualquier procedimiento que implique trasplante de células madre. Una vez establecida o en fase crónica, lo primero es averiguar, a ser posible, con pruebas documentables, si están ambos ojos afectados o sólo uno. La afectación unilateral cambia radicalmente el planteamiento quirúrgico ya que contaremos con una reserva de células madre. Por último, valorar si la IL es parcial o total. Si es parcial podremos “luchar” para que la parte sana pueda suplir a la parte afecta. Todo se debe valorar en global y tener toda la información en nuestra mano para poder acertar en el planteamiento quirúrgico. Es decir, no hay que precipitarse. No hay que olvidar que el limbo debe estar

restablecido para realizar cualquier procedimiento para mejorar la transparencia corneal ya sea queratoplastia penetrante o lamelar.

### **I.9.1.1. PRINCIPIOS GENERALES**

Primero hay que controlar y evitar en la medida de lo posible los factores causales: lentes de contacto, medicación tópica, conservantes, inflamación, etc. Sin el control sobre estos factores cualquier tratamiento posterior está abocado al fracaso más absoluto.

De igual forma, antes de realizar cualquier tratamiento quirúrgico cualquier patología concomitante asociada debe corregirse ya que si no, también corremos el riesgo de que fracasemos. Deberían abordarse con anterioridad a cualquier proceso limbar: hipertensión ocular, síndrome de ojo seco, inflamación, simbléfaron, malposiciones palpebrales e incluso una eventual catarata. En el caso de la catarata se podría abordar conjuntamente con una queratoplastia lamelar anterior o penetrante si la transparencia no nos permite la cirugía de la misma (21).

En concreto, y hablando especialmente de enfermedades mucosinequiantes, es imprescindible controlar la inflamación y el ojo seco. Un ojo seco severo es una contraindicación para llevar a cabo un transplante limbar. Para ello, el uso de lágrimas artificiales además de mejorar el confort del paciente mejora el estado del ojo y controla el ambiente proinflamatorio donde luego vamos a realizar el trasplante (204).

Por otro lado, en muchas ocasiones el transplante limbar no tiene por objetivo mejorar la agudeza visual, pero si al menos, mejorar los síntomas y ser un paso previo indispensable de cara a una queratoplastia penetrante o lateral para restaurar la agudeza visual. Si no se considera esta premisa, cualquier proceso reparativo de queratoplastia tanto penetrante como

lamelar, fracasará, ya que sólo produce un reemplazo temporal del epitelio corneal. Además para reparar el limbo y repoblarlo con células madre limbares hay que tener muy en cuenta que debe haber un nicho adecuado que aloje a esas células madre y les provea de un microambiente adecuado para su correcta homeostasis. Sin estas premisas conseguidas, el fracaso está asegurado.

### I.9.1.2. SUERO AUTÓLOGO

El uso de *suero autólogo* se ha mostrado muy efectivo en distintas patologías. El efecto beneficioso de éste se debe a la gran concentración en factores de crecimiento como el epidérmico y transformador del crecimiento de fibroblastos  $\beta$ , factores neuronales como la sustancia P, vitamina A, antiproteasas y anticolasinas entre otras sustancias(214, 215). El efecto del suero autólogo es similar en este sentido al ejercido por el transplante de membrana amniótica, ya que debido a estos factores aceleraría la cicatrización de defectos epiteliales (215, 216).

En las enfermedades mucosinequiantes existe una deficiencia en la secreción de mucina por disminución de células caliciformes, haciendo que las lágrimas no adecuen la superficie corneal. Se ha demostrado *in vitro* que el suero autólogo aumenta la expresión del receptor MUC-1. Se postula que la vitamina A es la responsable de este efecto, debido a que alcanza concentraciones cien veces superiores en el suero autólogo con respecto a la lágrima natural (215).

### I.9.1.3. MEMBRANA AMNIÓTICA

La membrana amniótica (MA) forma parte de las membranas ovulares y está constituida por un epitelio monocapa de células cuboideas, una membrana basal y una

matriz estromal. Esta última capa se divide a su vez en un estrato compacto, una capa de fibroblastos y una capa esponjosa. La membrana amniótica tiene un efecto protector mecánico y otro biológico derivado de los factores de crecimiento segregados por su epitelio. Favorece la migración celular, la adhesión de células epiteliales, la proliferación de las células madre limbares y su diferenciación en células epiteliales corneales y además, previene la apoptosis. Por otro lado, la matriz estromal reduce la formación de tejido de granulación y cicatrización, disminuyendo la neovascularización y la inflamación a través de antiproteasas. No sólo eso, sino que realiza un efecto barrera contra mediadores proinflamatorios contenidos en la lágrima y contra agentes externos traumáticos, infecciosos y proinflamatorios. Existen numerosos casos en la literatura donde se ha usado de forma satisfactoria la membrana amniótica, como en queratopatía bullosa(217), insuficiencia limbar en aniridia(218), cirugías de pterigium recidivado(219), quemaduras químicas y térmicas oculares(220, 221), penfigoide cicatricial ocular (222) y síndrome de Stevens-Johnson(223).

Además como veremos más adelante se ha usado como transporte y soporte en el cultivo y transposición de células limbares, conjuntivales y mesenquimales (224, 225).

El trasplante de membrana amniótica tiene un papel importante como coadyuvante en cualquier tratamiento quirúrgico limbar debido al aporte de factores de crecimiento, al efecto protector, el efecto estimulador de la proliferación y la migración epitelial. En especial en IL parciales, ya que estimula a las células madre limbares supervivientes a reepitelizar la totalidad de la córnea, siempre asociándolo a epiteliectomía del epitelio anómalo invasor.

## **I.9.2. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO**

### **I.9.2.1. HISTORIA DEL TRASPLANTE LIMBAR**

En 1989, Kenyon y Tseng (226), demostraron la utilidad del trasplante de limbo en casos de insuficiencia límbica completa secundaria a causticaciones térmicas o químicas. Estos hallazgos confirmaron la utilidad del epitelio limbar como fuente de células madre en la regeneración de esta población celular destruida(227). Mediante este procedimiento se trasplantan células madre viables procedentes del propio individuo (autotrasplante límbico) o de un donante (alotrasplante límbico) en casos de afectación bilateral, basándose en la localización de las células madre limbocorneales en las empalizadas de Vogt del limbo corneal.

La técnica descrita por ellos consistía en el trasplante de dos fragmentos limbocorneales grandes, de 6-7 mm de arco de limbo, extirpados del ojo sano. Previamente, prepararon el ojo receptor extirpando el tejido fibrovascular anómalo asociado a la insuficiencia límbica. La recuperación del fenotipo epitelial corneal fue confirmada con la ausencia de células caliciformes en la citología de impresión.

El trasplante de limbo no debe hacerse en la fase aguda tras la causticación debido a la alta posibilidad de fracaso asociada a la gran inflamación, debiéndose esperar varios meses para llevar a cabo tal tratamiento(228). Esta técnica del autotrasplante de limbo está indicada como primer tratamiento quirúrgico en causticación química o térmica unilateral de la córnea, tras la cual puede llevarse a cabo la queratoplastia en los casos de opacidad estromal para conseguir la recuperación visual(229). El autotrasplante de limbo también ha demostrado ser útil en el tratamiento de otras patologías como pterigium recurrentes(230) o amiloidosis subepitelial (231).

Posteriormente se estudió tanto en humanos como en animales con insuficiencia límbica completa, la capacidad que tenía el trasplante de limbo de producir una regeneración del fenotipo epitelial corneal, disminuir la vascularización corneal y mejorar la superficie epitelial (232-235). El uso adicional de membrana amniótica parece contribuir a una mayor tasa de éxito y menores complicaciones según algunos autores (236) pero no para otros (235), según los cuales el trasplante adicional de membrana amniótica no mejora el beneficio del tratamiento con autotrasplante de limbo.

La principal desventaja del autotrasplante es la pérdida limbocorneal que implica la creación de dos explantes limbares en el ojo sano, ya que supone un riesgo de desarrollar insuficiencia límbica en el ojo sano. De hecho, este hecho conlleva las reticencias y frecuentemente el rechazo por parte del paciente de intervenir su “ojo único”, que es el único sano y el que les ayuda a realizar toda su vida con más o menos normalidad. Este gran impedimento ha inducido a los investigadores a desarrollar otras vías con menos riesgos. Éstas son las técnicas de cultivo *ex vivo* que a través de la expansión en cultivos de la células limbares provenientes de explantes limbares sanos más pequeños y por otro lado, el uso de otros tipos celulares: mucosa oral, conjuntivales, mesenquimales,...

Respecto al tratamiento quirúrgico existen múltiples tratamientos con diversas siglas usadas en la literatura y que usan diferentes tejidos. Se expone en la tablas adjuntas la nomenclatura más reciente, propuesta por la *Cornea Society* y publicada en 2011(237)(**tabla 8 y 9**).



Tabla 8. Clasificación de los procedimientos quirúrgicos para la rehabilitación de la superficie ocular (“Cornea Society”)

Procedimiento		Abreviatura	Donante	Tejido transplantado
Transplante conjuntival	<i>Conjunctival autograft</i>	CAU	Ojo adelfo	Conjuntiva
	<i>Cadaveric conjunctival allograft</i>	c-CAL	Cadáver	Conjuntiva
	<i>Living related conjunctival allograft</i>	Ir-CAL	Vivo familiar	Conjuntiva
	<i>Living non related conjunctival allograft</i>	Inr-CAL	Vivo no familiar	Conjuntiva
Transplante limbar	<i>Conjunctival limbal autograft</i>	CLAU	Ojo adelfo	Limbo y Conjuntiva
	<i>Cadaveric conjunctival limbal allograft</i>	c-CLAL	Cadáver	Limbo y Conjuntiva
	<i>Living related conjunctival limbal allograft</i>	Ir-CLAL	Vivo familiar	Limbo y Conjuntiva
	<i>Living non related conjunctival limbal allograft</i>	Inr-CLAL	Vivo no familiar	Limbo y Conjuntiva
	<i>Keratolimbal autograft</i>	KLAU	Ojo adelfo	Limbo y córnea
	<i>Keratolimbal allograft</i>	KLAL	Cadáver	Limbo y córnea
Transplante de mucosas	<i>Oral mucosa autograft</i>	OMAU	Receptor	Mucosa oral
	<i>Nasal mucosa autograft</i>	NMAU	Receptor	Mucosa nasal
	<i>Intestine mucosa autograft</i>	IMAU	Receptor	Mucosa intestinal
	<i>Peritoneal mucosa autograft</i>	PMAU	Receptor	Peritoneo

Tabla 9. Clasificación de procedimientos quirúrgicos para la rehabilitación de la superficie ocular basados en ingeniería tisular ("Cornea Society").

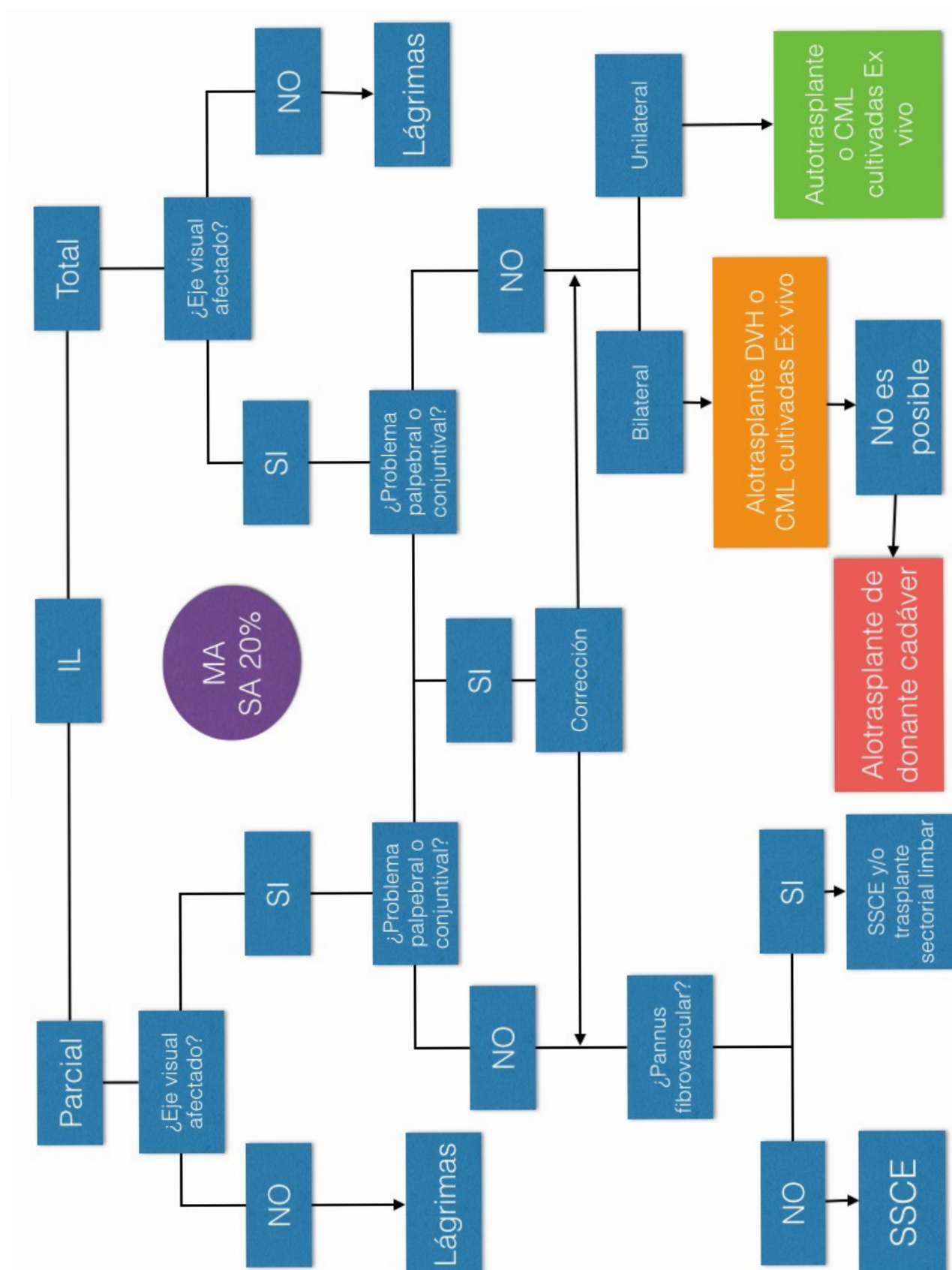
Procedimiento		Abreviatura	Donante	Tejido transplantado
Transplante de células conjuntivales cultivadas <i>Ex vivo</i>	<i>Ex vivo cultivated conjunctival autograft</i>	EV-CAU	Ojo receptor	Conjuntiva
	<i>Ex vivo cultivated cadaveric conjunctival allograft</i>	EVc-CAL	Cadáver	Conjuntiva
	<i>Ex vivo cultivated living-related conjunctival allograft</i>	EV Ir-CAL	Familiar vivo	Conjuntiva
	<i>Ex vivo cultivated living non-related conjunctival allograft</i>	EV Inr-CAL	Vivo No familiar	Conjuntiva
Transplante de células limbares cultivadas <i>Ex vivo</i>	<i>Ex vivo cultivated limbal autograft</i>	EV LAU	Ojo receptor	Limbo/córnea
	<i>Ex vivo cultivated cadaveric limbal allograft</i>	EV c-LAL	Cadáver	Limbo/córnea
	<i>Ex vivo cultivated living-related limbal allograft</i>	EV Ir-LAL	Familiar vivo	Limbo/córnea
	<i>Ex vivo cultivated living non-related limbal allograft</i>	EV Inr-LAL	Vivo No familiar	Limbo/córnea
Transplante de células de mucosa oral cultivadas <i>Ex vivo</i>	<i>Ex vivo cultivated oral mucosa autograft</i>	EV OMAU	Receptor	Mucosa oral

### I.9.2.2. ESQUEMA GENERAL DEL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

Dentro del tratamiento quirúrgico de la insuficiencia limbar hay que diferenciar primero si está en fase aguda o ya está el ojo “tranquilo”. Segundo, si la afectación es bilateral o unilateral, cerciorándose si es posible con los métodos diagnósticos antes comentados y con pruebas documentables. Tercero, si la insuficiencia es parcial o total. Cada una de estas disquisiciones nos marcará la ruta terapéutica y los objetivos a conseguir (**Figura 14**).

En las insuficiencias limbares parciales que no afecten a eje visual deberíamos sólo realizar tratamiento conservador médico incluyendo lágrimas artificiales, hemoderivados incluso lentes de contacto. En insuficiencia limbares parciales que afecten eje visual, la epiteliectomía secuencia conjuntival sectorial denominada en inglés *Sequential Sectoral Conjunctival Epitheliectomy* (SSCE) es de elección, incluso varias veces hasta que el limbo sano pueda suplir la función de la zonas dañadas y que la córnea se recubra de epitelio corneal normal. En las IL totales unilaterales, en las que se ha demostrado que el ojo adelfo está sano, una opción muy buena es el autoinjerto limbar. En el caso de las IL totales bilaterales si es posible el alotrasplante de donante vivo histocompatible (DVH), normalmente familiar del paciente, será de elección, buscando el mayor ajuste posible de histocompatibilidad. Como última opción, por mayor tasa de fracaso, el alotrasplante de donante cadáver (DC)(238).

La ventaja del autoinjerto y del donante histocompatible es la frescura, ya que el tiempo desde que se extraen los explantes limbares hasta que se transplantan es mínimo. En el de donante cadáver mínimo 24-48h pasarán antes de transplantarse. Además en cuanto al problema de histocompatibilidad será menor en el autoinjerto y luego en DVH con buen ajuste de histocompatibilidad, que en el de donante cadáver. Por otro lado se evitan en el



**FIGURA 14. ALGORITMO DEL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA INSUFICIENCIA LIMBAR**

IL: Insuficiencia de limbo; MA: Membrana amniótica; SA: Suero autólogo; CML: Células madre limbares; DVH: Donante vivo histocompatible; SSCE: Epiteliectomía conjuntival

caso del autoinjerto, el problema de posibles contagios infecciosos.

### **I.9.2.3. EPITELIECTOMÍA CONJUNTIVAL SECTORIAL SECUENCIAL**

Esta técnica fue descrita por Dua como Sequential Sectorial Conjunctival Epitheliectomy (SSCE) para tratamiento de las IL parciales con afectación del eje visual para “ayudar” a que las células madre limbares que quedan intactas regeneren la superficie epitelial corneal(239). Se requiere desbridar y retirar el tejido conjuntivalizado que recubre de forma anómala la córnea. De esta forma, se consigue que el epitelio sano proveniente de zonas limbares funcionales, pueda crecer y recubrir la córnea, con epitelio corneal normal. Se retira con cuchillete tipo Crescent o hemosteta seca haciendo especial énfasis en no dejar nada de epitelio anómalo ya que debido a la inhibición por contacto no permitiría que el epitelio sano recubriera toda la córnea. Normalmente son necesarias repetidas desepitelizaciones cada 24-48 h hasta que el epitelio corneal sano restablece la superficie corneal. Tras cada SSCE se colocará lente de contacto terapéutica, se instilarán colirios antibióticos y lágrimas artificiales sin conservantes.

Por otro lado, si observamos que la afectación corneal y limbar es total, no debemos realizar SSCE, sino dejar que la conjuntivalización sea completa y esperar a que la inflamación disminuya durante varios meses para plantear un procedimiento quirúrgico. Dua plantea que es mejor un epitelio malo que no tener ningún epitelio (240).

### **I.9.2.4. AUTOTRASPLANTE LIMBAR Y TRASPLANTE LIMBAR DE DONANTE VIVO HISTOCOMPATIBLE**

Ambos tienen unas características comunes que los hacen mucho más efectivos y duraderos en el tiempo. Entre estas características está su frescura. El tiempo que pasa desde que se extrae hasta que se implantan es mínimo y mucho menor que los alotrasplantes de

cadáver, garantizando la viabilidad de las células madre limbares allí ubicadas. Con respecto a la inmunohistocompatibilidad, los alotrasplantes de cadáver, tienen más rechazo y por tanto mayor posibilidad de complicaciones a largo plazo que en los autotrasplantes y los alotrasplantes de donante vivo histocompatible (DVH). En éstos últimos, dependerá de cuan parecidos sean los HLA de los sujetos. Reinhard y cols. analizaron la compatibilidad de HLA clase I y II en alotrasplantes DVH, describiendo una tasa de éxito en éstos del 65 % cuando estos desajustes eran 0 ó 1, del 41 % cuando eran de 2 a 6 y una tasa de éxito del 14 % si no se correlacionaba ninguno (241). Además esto se refrenda en otros estudios(238) y con la observación de este mismo hecho en queratoplastias penetrantes (242, 243).

En estos procedimientos se usará anestesia general normalmente con relajantes musculares. Con suturas de seda de 4-0 se fijarán los músculos rectos superior e inferior para poder mover el ojo sin que nos afecte al campo quirúrgico. Se toman dos segmentos horarios limbares del ojo donante normalmente a las 6 y las 12 horas, con límite posterior de unos 3 mm de conjuntiva y anteriormente justo por delante de las arcadas vasculares limbares siempre menos de un milímetro de córnea periférica (**figura 15, donante, ilustración 1**). La profundidad la podemos marcar en laterales y anteriormente con cuchillete precalibrado de diamante a unas 200 micras o con cuchillete de acero con tope de 250 micras -no existen inferiores a 250 micras- (Atomic Edge 250 micras, Beaver-Visitec). Se comienza disecando conjuntiva y separándola de la cápsula de Tenon, avanzando anteriormente y desde los laterales con un cuchillete tipo Crescent hasta el límite anterior que se habrá marcado con ese mismo cuchillete. Para completar el colgajo a nivel anterior se usarán unas tijeras Vannas. Se coloca el colgajo en una esponja húmeda con la cara epitelial hacia arriba y se cubre, humedeciéndolo de forma intermitente con BSS. Se sutura con nailon 10-0 la conjuntiva en cada ángulo del lecho que se ha tomado recubriendo con

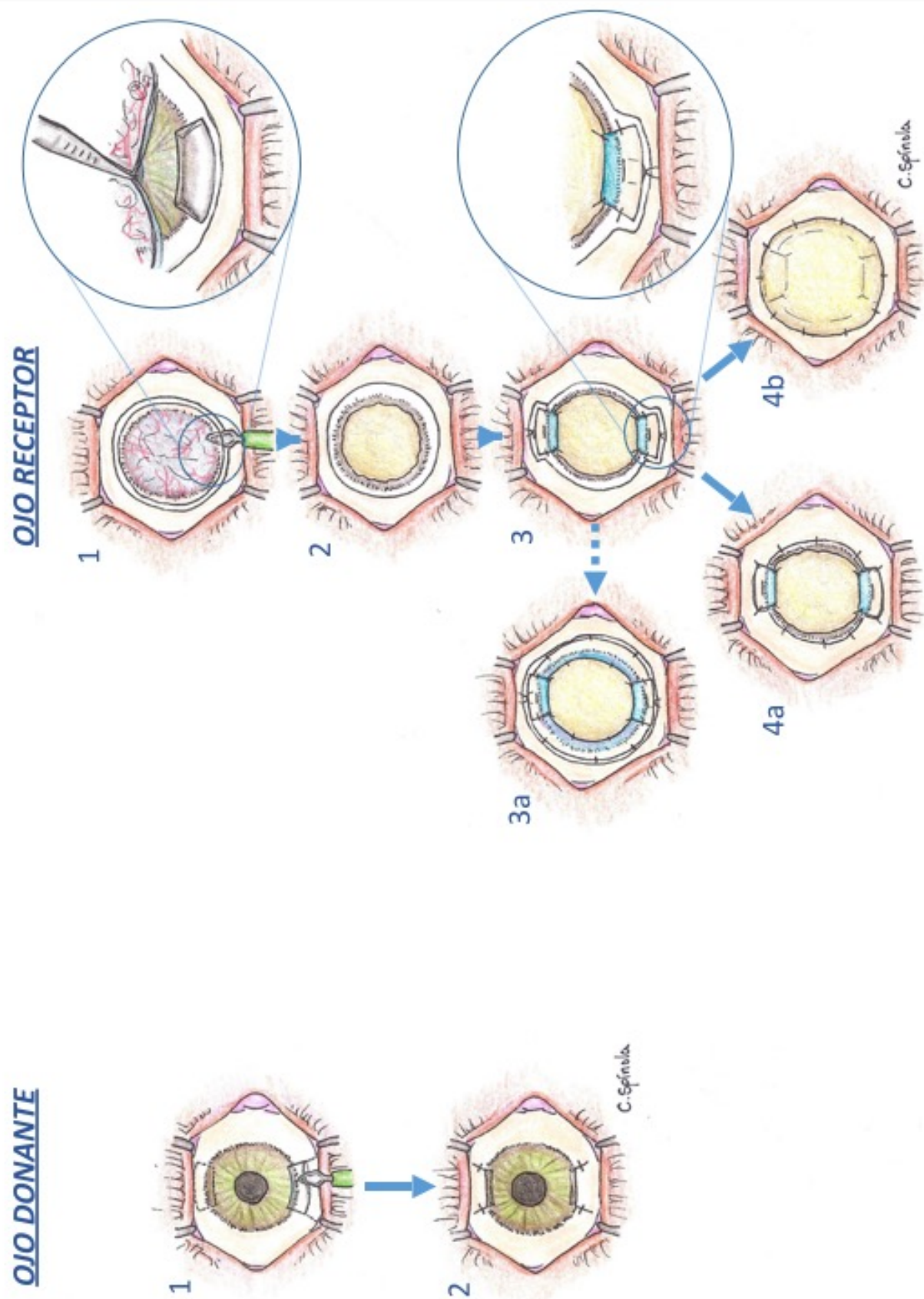


FIGURA 15. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DE AUTOTRASPLANTE LIMBAR

conjuntiva dicha zona (**figura 15, donante, ilustración 2**). Las suturas reabsorbibles producen más molestias e irritación (240). Las suturas del ojo donante se retirarán en 1 semana. El tratamiento postoperatorio de este ojo será tratamiento tópico antibiótico, corticoideo y lágrimas artificiales.

En el ojo receptor, se aplicará la misma fijación de los rectos superior e inferior. Posteriormente se realizará peritomía conjuntival en los 360° comenzando a 1-2 mm del limbo. Se retira el pannus fibrovascular de forma centrípeta con un escarificador o el cuchillete de Crescent y posteriormente se realiza un lecho de la misma forma que se ha tallado el donante previamente, a las 6 y a las 12 horas (**figura 15, receptor, ilustración1**).

En este momento, si la superficie corneal desnuda que queda es muy irregular podemos considerar colocar un primer parche de membrana amniótica con cara epitelial hacia arriba de unos 9-10 mm suturada a córnea con sutura continua de nailon dejando el nudo de tal forma que no interfiera en el trasplante limbar (**figura 15, receptor, ilustración 2**). Alternativamente se puede usar pegamento biológico.

Los explantes limbares del donante se colocan normalmente en el mismo sitio, a las 6 y a las 12 horas del receptor, sobreponiendo el borde corneal al primer disco de membrana amniótica, si se ha usado. Se fija primeramente al estroma corneal receptor mediante unos puntos de sutura diagonales simples cogiendo muy poco del lado corneal donante y largo en el estroma corneal receptor, siendo enterrados posteriormente. Otras dos suturas simples se colocan a ambos lados del explante en la zona de unión entre la conjuntiva y el limbo donante, suturándolo a la conjuntiva y epiesclera del receptor. Mediante una sutura de colchonero, se coloca de forma paralela al limbo donante, situando la sutura desde conjuntiva donante en la zona justo posterior a limbo donante, al mismo nivel que las dos suturas anteriores, hacia epiesclera del receptor. Esta sutura de colchonero impide el



movimiento de la conjuntiva donante en caso de edema y/o hemorragia (**figura 15, receptor, ilustración 3**). Por último, se sutura conjuntiva donante con la receptora con sutura continua o puntos sueltos con nailon 10-0. De la misma forma, se sutura la conjuntiva del receptor que queda entre los explantes a la epiesclera receptora (**figura 15, receptor, ilustración 4a**). De forma alternativa, se puede finalizar la cirugía realizando un segundo recubrimiento de membrana amniótica, pero este recubrirá limbo y la córnea de tal manera que la conjuntiva se superponga a la membrana amniótica asegurándonos que si crece otra vez el epitelio conjuntival lo hará sobre la segunda membrana amniótica y no por la córnea, ya que esta segunda membrana amniótica se puede quitar en 7-10 días si es que no ha desaparecido espontáneamente (**figura 15, receptor, ilustración 4b**). En esta misma localización, José Luis Güell y Oscar Gris en 2006 sugirieron interponer entre los dos explantes autólogos, injertos limbares de cadáver, preferiblemente en un segundo acto quirúrgico, mejorando la supervivencia del trasplante, según describió posteriormente Dua HS en 2007 (**figura 15, receptor, ilustración 3a**) (240).

El tratamiento postoperatorio para el ojo receptor y el donante serán colirios antibióticos, corticosteroides y lágrimas artificiales, todos sin conservantes. Se puede usar lente de contacto terapéutica para disminuir molestias. Si la epitelización se retrasa podemos usar colirio de suero autólogo al 20 % en vez de lágrimas artificiales y reducir dosis de corticoides hasta que la epitelización sea completa. Las suturas se retirarán a los 10-14 días.

#### **I.9.2.5. ALOTRASPLANTE LIMBAR DE DONANTE CADÁVER**

Si la insuficiencia límbica es bilateral, debido a la imposibilidad de llevar a cabo el trasplante de células autólogas, se recurre al trasplante alogénico de donante cadáver (244). Este tipo de trasplante se puede realizar en la fase aguda, v.g., en causticaciones, para ir

restableciendo la superficie corneal sin tocar el ojo adelfo y sin malgastar la posibilidad de usar el de un donante vivo histocompatible, ya que en fase aguda el pronóstico de supervivencia del injerto será aun peor (240).

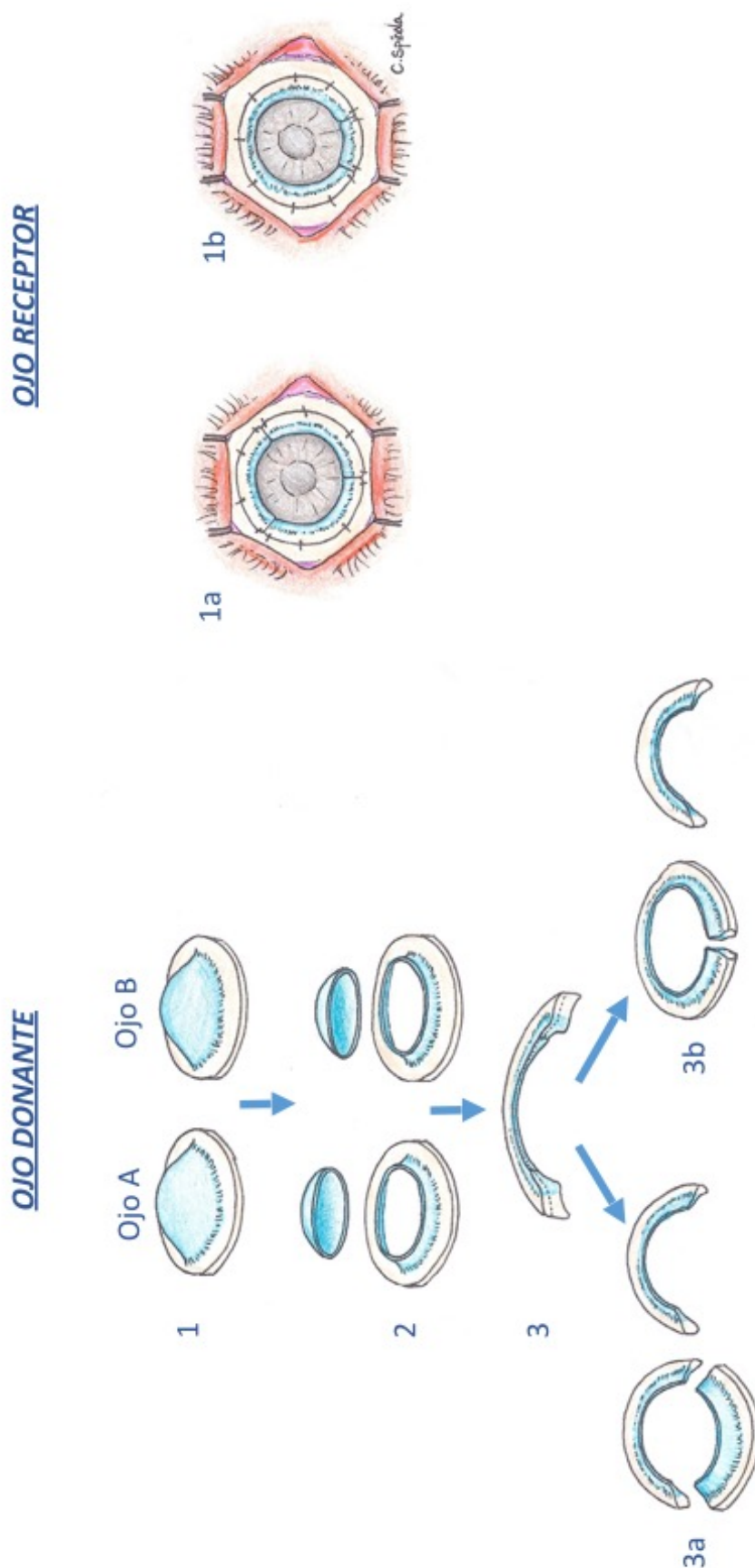
Una de las ventajas es la mayor disponibilidad que tenemos de éste, ya que podemos aprovechar el rodete limbar de las queratoplastias y dispondremos del limbo entero. Por el contrario, la principal desventaja es la falta de inmunocompatibilidad y de frescura, mínimo 24-48 h desde la extracción, sin contar la inadecuada manipulación del limbo en dicha extracción. En las series más largas, los alotrasplantes cadavéricos no tienen una supervivencia mayor de 5 años (238). Por el contrario, Holland y cols., tras tratar 31 ojos con insuficiencia límbica secundaria a aniridia, concluyeron que el alotrasplante queratolimbar es efectivo como tratamiento de esta patología (245). Además, observaron cómo los pacientes que reciben tratamiento inmunosupresor sistémico, alcanzan una mayor estabilidad de la superficie ocular y una mejor agudeza visual en comparación con aquellos pacientes que recibieron sólo inmunosupresión tópica.

El riesgo de rechazo y la necesidad de seguir un tratamiento inmunosupresor postoperatorio -con sus efectos secundarios- si la compatibilidad HLA no es completa es una de sus grandes desventajas (231, 246-249). Maruyama-Hosoi y cols. encontraron en una serie de 121 alotrasplantes de limbo reacciones de rechazo en un 13% de los casos a pesar del tratamiento inmunosupresor sistémico, siendo el rechazo generalizado en los que recibieron sólo inmusupresión tópica salvo en un caso (250). Los cambios agudos en el injerto limbar en los que se basaron para valorara el rechazo, fueron los defectos epiteliales, el edema y la ingurgitación vascular alrededor del injerto. Por tanto, consideran que la supresión de la reacción inmune en el alotrasplante constituye casi la única posibilidad para el éxito de este tratamiento. Algunos casos publicados no han presentado rechazo a pesar de

no seguir tratamiento inmunosupresor tras el trasplante alogénico de cadáver, pero hay que destacar que son estudios sólo a medio plazo (244). El tratamiento inmunosupresor se basa en los corticoides sistémicos, la ciclosporina A y otros agentes inmunosupresores como el micofenolato mofetilo y el tacrolimus. Estos tratamientos tienen como efectos secundarios el aumento del riesgo de infección así como otras complicaciones sistémicas. Es por tanto necesario hacer un seguimiento sistémico y continuado en el tiempo para controlar las posibles complicaciones (251, 252).

Hay autores que basan el tratamiento inmunosupresor en la compatibilidad HLA, ya que los resultados son aparentemente mejores cuando hay mayor compatibilidad HLA (253).

La técnica quirúrgica de extracción del explante limbar de donante cadavérico dependerá de si disponemos del globo entero o sólo del casquete esclerocorneal anterior (**figura 16, receptor, ilustración 1**). Este último es más frecuente por el uso en queratoplastias. Después de trepanar el botón corneal para la queratoplastia (**figura 16, donante, ilustración 2**), el rodete limbar se puede disecar para obtener una lamela de 200-250 micras(240) o, como alternativa, disecar desde córnea hacia esclera a una profundidad tal como para dejar un tercio anterior del espesor corneal (**figura 16, donante, ilustración 3**) (245). Luego se continua realizando la disección con cuchillete Crescent hasta pasar limbo llegando a un milímetro de esclera, dejando un pequeño colgajo de conjuntiva para conservar la estructura de las empalizadas de Vogt. Luego se corta radialmente con tijeras Westcott para obtener fragmentos de la forma deseada, usando dos ojos de donante por cada uno de receptor ya que el injerto será colocado en el borde posterior del limbo del receptor aumentando así la circunferencia a cubrir, de modo que usaremos tres mitades de dos ojos o un anillo completo más una cuña del segundo ojo (**figura 16, donante, ilustraciones 3a y 3b**). En el donante preparamos el lecho de la misma



**FIGURA 16. DESCRIPCIÓN DE VARIAS TÉCNICAS QUIRÚRGICAS DEL ALOTRASPLANTE LIMBAR DE CADÁVER.**

forma que en el autotrasplante retirando el tejido fibrovascular, incluyendo la posibilidad de colocar membrana amniótica, tal y como hemos descrito anteriormente, aunque como diferencia, no tallaremos los “huecos” para los explantes de la 6 y 12 ya que aquí se recubre toda la circunferencia limbar.

Posteriormente se suturan los explantes de donante cadáver intentando recubrir toda la circunferencia limbar del receptor, con puntos sueltos enterrados con nylon 10-0, en zona interna desde el explante hasta estroma corneal receptor y en zona externa coincidiendo con el mismo sector horario del explante suturándolo a epiesclera y conjuntiva receptora que se ha disecado en la peritomía previa (**figura 16, receptor, ilustraciones 4a y 4b**).

El control de la inflamación postoperatoria es importante ya que la inflamación crónica del estroma limbar constituye un factor de riesgo para estos tratamientos (226). Dua y cols. han observado que en casos con inflamación intensa, las colagenasas presentes en la superficie ocular pueden producir la necrosis de la membrana amniótica (254).

El tratamiento postoperatorio tópico será el mismo que en el autotrasplante limbar. En el alotrasplante de donante vivo histocompatible y de cadáver será necesaria inmunosupresión a largo plazo, siendo descrito en la literatura el uso de ciclosporina (227), tacrolimus(255), rapamicina(256), y micofenolato mofetilo(241). Por ello, se requerirá el control de efectos secundarios de estos tratamientos (257). La lente de contacto terapéutica postoperatoria es una práctica habitual en el postoperatorio (258, 259).

La función lagrimal y deformidad palpebral constituyen factores de riesgo en la reconstrucción de la superficie ocular (257, 260). El manejo de las alteraciones palpebrales, la función lagrimal y la fibrosis de la superficie ocular constituyen la clave del éxito en la rehabilitación visual.

En cualquier tipo de trasplante limbar habrá que realizar SSCE si observamos epitelio conjuntival invadiendo córnea salvo en la opción en la que ponemos una segunda capa de membrana amniótica en la cual puede retirarse a los 7-10 días como describimos.

### **I.9.3. CULTIVO CELULAR *EX VIVO* PARA INSUFICIENCIA DE LIMBO**

Como se ha descrito previamente, la regeneración de la población limbocorneal es necesaria para la recuperación de la visión y de la superficie corneal normal. La posibilidad de recuperar la función limbar comenzó con el trasplante de limbo, descrito por Kenyon y Tseng, luego se implementó con la posibilidad del cultivo *ex vivo* de dichas células madre provenientes de distintos tejidos y actualmente se está investigando en nichos artificiales y distintas poblaciones celulares como las células mesenquimales. Aunque queda mucho camino por recorrer creemos que la evolución en el campo de la biotecnología permitirá salvar muchos de los escollos que teníamos hasta ahora, principalmente el de no disponer de tantas células madre autólogas como se requeriría.

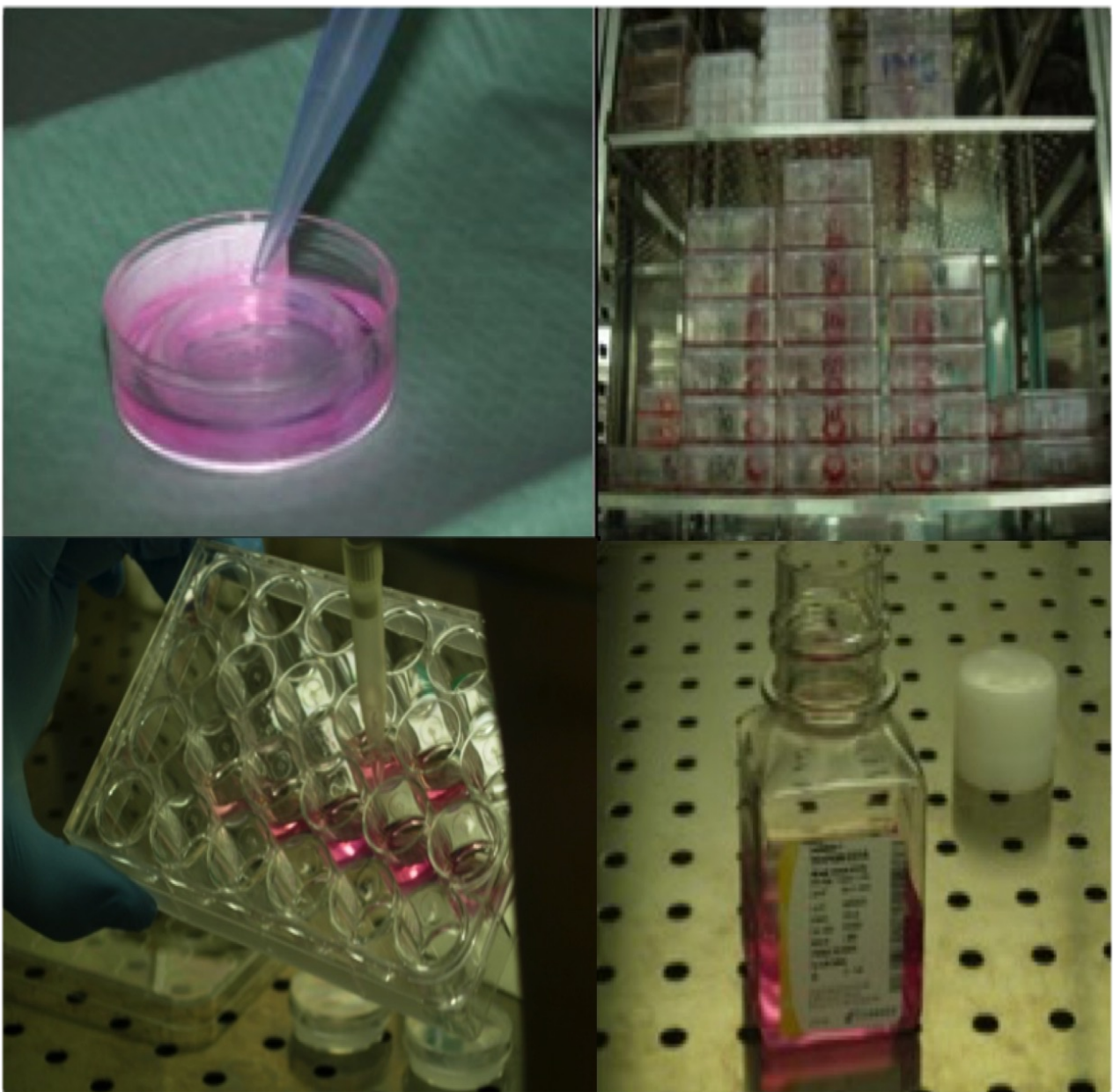
#### **I.9.3.1. CULTIVO *EX VIVO* DE CÉLULAS LIMBARES**

Una forma de minimizar el daño del ojo donante es la expansión *in vitro* de células epiteliales limbares para su posterior implante.

Esta técnica consiste en extirpar una pequeña muestra de tejido limbocorneal para expandir las células en el laboratorio. El cultivo se lleva a cabo sobre un soporte, que habitualmente se trata de membrana amniótica, debido a la similitud de su membrana basal con la del epitelio corneal. La duración del cultivo varía entre 2 y 4 semanas, manteniendo el cultivo con cambios periódicos del medio (**figura 17**). Los cultivos y el crecimiento celular se monitorizan mediante el análisis de las células por inmunohistoquímica con anticuerpos específicos de células epiteliales y células CAT (células progenitoras). Llegado el momento óptimo del cultivo celular, se procede al trasplante de la membrana amniótica como soporte de dicho cultivo. Para preparar el lecho receptor, se extirpa el tejido

fibrovascular asociado a la insuficiencia límbica. Posteriormente se trasplanta el injerto de membrana amniótica suturándolo a córnea y a conjuntiva.

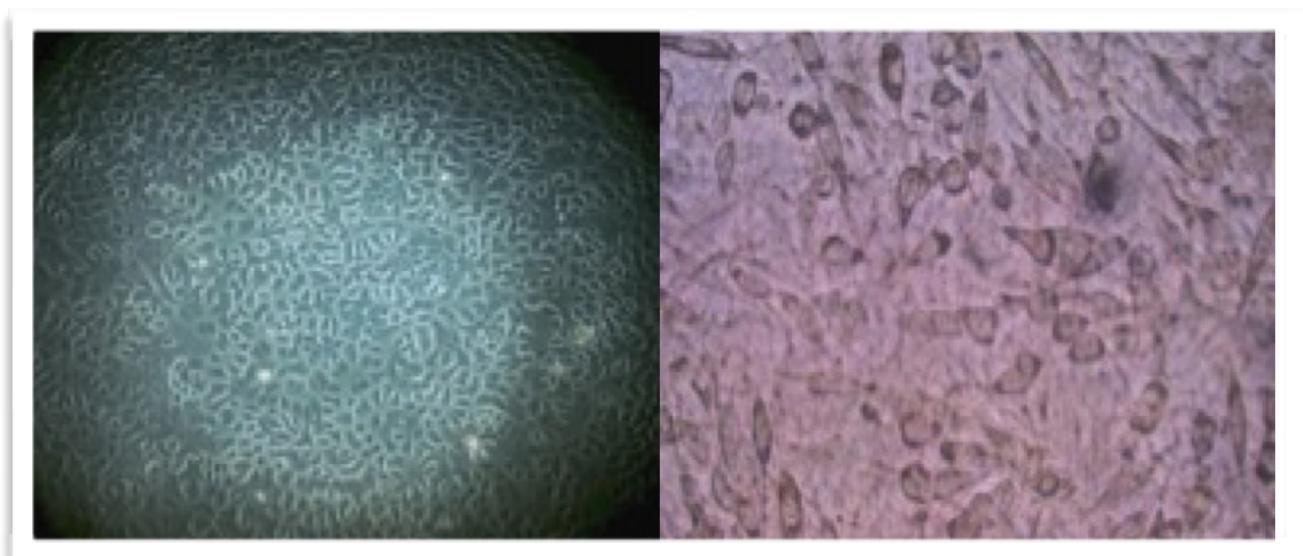
Diversos autores han demostrado como las células madre limbocorneales expandidas *ex vivo* pueden reconstruir con éxito la superficie corneal en casos de insuficiencia límbica completa unilateral (261-266).



**FIGURA 17. DIVERSAS ETAPAS DEL CULTIVO EX VIVO DE CÉLULAS LIMBARES**



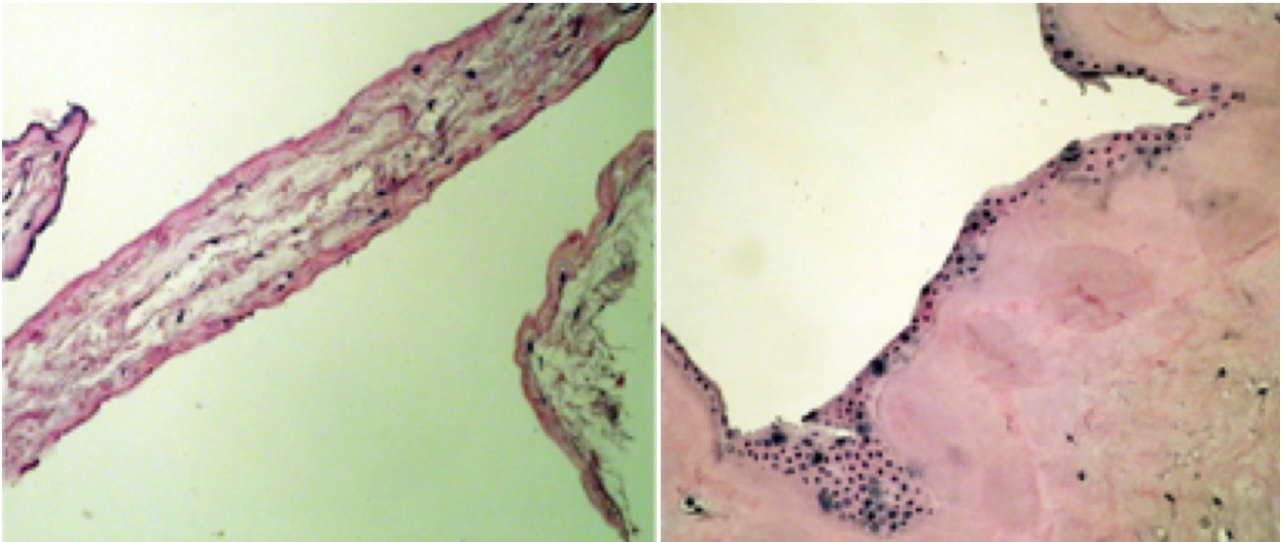
Esta técnica además permite confirmar histológicamente la existencia de epitelio corneal normal y la viabilidad de las células epiteliales previamente al trasplante (247, 259, 267, 268) (**figura 18**).



**FIGURA 18. CÉLULAS CULTIVADAS CON MORFOLOGÍA EPITELIAL**

Pellegrini y cols. fueron los primeros en demostrar que estas células madre limbocorneales cultivadas y expandidas “*in vitro*” pueden ser trasplantadas con éxito en ojos dañados permitiendo la regeneración de la superficie corneal y la recuperación de la visión (269). Sin embargo, los casos de insuficiencia límbica completa secundarios a patologías inflamatorias crónicas de origen inmune (síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide cicatricial, etc.) presentan una tasa de éxito menor (270).

Durante la expansión *ex vivo* sobre membrana amniótica se preservan la tasa de replicación, la cinética del ciclo celular y las características fenotípicas de las células progenitoras del epitelio limbar y conjuntival (261, 271, 272). Las células madre del epitelio limbocorneal son expandidas y preservadas en el cultivo sobre membrana amniótica, dando lugar a un epitelio estratificado de fenotipo indiferenciado similar al epitelio limbar *in vivo* (261, 273)(**figura 19**).



**FIGURA 19. CULTIVO SOBRE MEMBRANA AMNIÓTICA DENUDADA.**

### **I.9.3.2. CULTIVO *EX VIVO* DE CÉLULAS EPITELIALES DE MUCOSA ORAL AUTÓLOGA**

Desde hace ya unos años, debido a los inconvenientes del trasplante alogénico en casos de insuficiencia límbica bilateral -en los que no hay disponibilidad de células madre limbares autólogas-, tales como el rechazo o los asociados a la inmunosupresión farmacológica, se está investigando en nuevas técnicas que eviten dichos problemas.

Nakamura y cols. desarrollaron el trasplante de células epiteliales cultivadas de mucosa oral autóloga, cuya principal ventaja consiste en la ausencia de la necesidad de tratamiento inmunosupresor postoperatorio(274). Al tratarse de un trasplante autólogo, permite reducir y acortar el tratamiento con corticoides tópicos postoperatorios. El trasplante de células epiteliales de la mucosa oral, cultivadas sobre membrana amniótica desnuda, permite obtener epitelio estratificado de características similares al epitelio corneal (275). El trasplante de láminas de epitelio sobre membrana amniótica consigue una epitelización rápida así como una regeneración de la superficie corneal, disminuyendo tanto el riesgo de

rechazo como las complicaciones asociadas al tratamiento inmunosupresor (276). La rápida epitelización que consigue, disminuye la inflamación epitelial y el defecto epitelial persistente. Además, el trasplante de cultivo de mucosa oral, con membrana amniótica como soporte, parece prevenir la cicatrización corneal y el depósito de lípidos, que ocurren con frecuencia en el estroma adyacente incluso después de un período postoperatorio de varios años.

Nishida y cols. comprobaron la reepitelización corneal de cuatro pacientes con síndrome de Stevens Johnson y penfigoide ocular cicatricial estudiados en el plazo de una semana (277). La técnica descrita por estos autores permite la obtención de láminas de epitelio de la mucosa oral cultivadas sobre plástico modificando la temperatura a lo largo del cultivo, sin utilizar ningún soporte ni sutura para su implante. Dichas láminas, van con un soporte periférico de plástico, que retiran una vez situadas en el ojo para luego aplicar una lente de contacto a modo de apósito. Se han comparado los resultados clínicos del trasplante de láminas de cultivo de células epiteliales de la mucosa oral sin soporte y con membrana amniótica como soporte siendo la tasa de supervivencia del injerto y la agudeza visual postoperatoria, significativamente mejores en los casos sin soporte, además de una menor incidencia de neovascularización postoperatoria (278). Otra ventaja del trasplante sin soporte es la técnica quirúrgica, que resulta mucho más sencilla al no ser necesarias las suturas ni la fijación del donante.

Inatomi y cols. llevaron a cabo dicha técnica en quince ojos de doce pacientes con insuficiencia límbica completa y ceguera corneal, en los que observaron una rápida epitelización a pesar de una cierta neovascularización corneal periférica, en un seguimiento a medio plazo (279). Los casos tratados corresponden a enfermedades de la superficie ocular bilaterales con alto riesgo de rechazo epitelial y de desarrollar complicaciones, en particular

pacientes jóvenes. Estos autores consideran que se trata de una técnica segura y útil, especialmente en pacientes jóvenes con afectación de la superficie ocular severa.

Nakamura y cols. también habían demostrado previamente la utilidad del trasplante de células autólogas de mucosa oral en conejos aunque se trata de un seguimiento corto (274, 280). Utilizando membrana amniótica humana como soporte, trasplantaron el cultivo de células procedentes de mucosa oral de conejo en ojos con insuficiencia límbica completa. Observaron que las células cultivadas adquirirían un tamaño y apariencia similar a las células epiteliales corneales y consiguieron la regeneración corneal en un seguimiento a corto plazo. La técnica que llevaron a cabo consistió en la toma de una biopsia de mucosa oral de entre dos y tres mm<sup>2</sup>, que cultivaron con un medio enriquecido con fibroblastos 3T3 sobre membrana amniótica desnuda durante dos ó tres semanas.

Con esta técnica se consiguen láminas de tejido epitelial sobre membrana amniótica a partir de una pequeña biopsia. Las características de las láminas de células de la mucosa oral cultivadas *ex vivo* son similares al epitelio corneal humano, formado por un epitelio estratificado de 3 a 5 capas celulares, células basales redondeadas y de pequeño tamaño, células superficiales aplanadas, microvellosidades apicales y buena transparencia. Las células epiteliales de la mucosa oral se encuentran en un estadio de diferenciación menor que los queratinocitos epidérmicos y pueden prolongarse en cultivo durante largos periodos sin que ocurra la queratinización. Además, estas células epiteliales de la mucosa oral *in vivo* son positivas para la citoqueratina 3, marcador de diferenciación corneal. Esto hace suponer que las células epiteliales de la mucosa oral, cultivadas sobre membrana amniótica, pueden diferenciarse en células epiteliales corneales, lo que justifica por la *plasticidad* de dichas células.

Sin embargo, en otros estudios, el patrón de citoqueratinas mantiene características del epitelio de la mucosa oral (281).

Nakamura y cols. después del éxito con modelos animales descrito un año antes, llevaron a cabo esta misma técnica también en pacientes con insuficiencia límbica completa, consiguiendo la estabilidad del epitelio corneal durante un seguimiento de casi catorce meses (282). Posteriormente, este mismo grupo llevó a cabo un estudio con una muestra mayor y un seguimiento más extenso (283). Encontraron mejora visual en el 95% de los ojos 6 meses tras la cirugía. A los 30 meses, el porcentaje de mejoría visual disminuyó al 53%. Según sus resultados, el trasplante de láminas de células epiteliales de la mucosa oral autólogas cultivadas resulta un tratamiento efectivo en la reconstrucción de la superficie ocular en la fase cicatricial de alteraciones graves de la superficie ocular. Otros estudios a largo plazo también concluyen que el trasplante de láminas de células epiteliales de la mucosa oral cultivadas ofrece una alternativa viable y segura en la reconstrucción de la superficie ocular (66). Sin embargo, el pronóstico para conseguir esa estabilidad de la superficie corneal está negativamente determinado por la existencia de defectos epiteliales preoperatorios.

Entre las complicaciones postoperatorias se encuentra *melting* estromal o la perforación tras defectos epiteliales persistentes, queratitis infecciosas, glaucoma y neovascularización.

Se han llevado a cabo estudios retrospectivos en 40 pacientes con insuficiencia límbica completa tratada con trasplante de láminas de células epiteliales de mucosa oral cultivadas, concluyendo que este tratamiento consigue una mejoría visual a largo plazo, incluso en pacientes con déficit lagrimal severo (284). El simbléfaron y la neovascularización demostraron ser factores pronósticos negativos en la mejoría visual.

El tratamiento agresivo pre y postoperatorio de los factores pronósticos que afectan al estado de la superficie ocular tras la cirugía es fundamental para conseguir un mejor pronóstico clínico tras los tratamientos reconstructivos de la superficie ocular. Principalmente, la hidratación de la superficie ocular y un ambiente no inflamatorio, que ayudan a mantener la estabilidad del epitelio de la superficie ocular(252).

### **I.9.3.3. CULTIVO *EX VIVO* DE CÉLULAS CONJUNTIVALES AUTÓLOGAS**

Otra alternativa estudiada en casos de insuficiencia límbica completa es el cultivo de células conjuntivales autólogas. En estudios con conejos se ha demostrado la formación de un epitelio escamoso estratificado morfológicamente similar al epitelio corneal y cuyas células basales expresan los marcadores de inmadurez p63 y ABCG2 (285). El epitelio resultante también expresa citoqueratinas de diferenciación corneal (citoqueratina 3/12). Estos hallazgos sugieren al trasplante de células conjuntivales cultivadas sobre membrana amniótica como alternativa para regenerar el epitelio corneal. Sin embargo, el seguimiento de estos estudios es muy corto, por lo que son necesarios estudios a más largo plazo para confirmar estos resultados.

Posteriormente se ha estudiado la viabilidad de cultivar células epiteliales conjuntivales de pacientes con insuficiencia límbica completa, analizando las citoqueratinas (CK3, CK19) (286), el marcador de proliferación Ki-67 y los marcadores de células Stem ABCG2 y p63 (287). De estos estudios se concluye que es posible cultivar células epiteliales conjuntivales ex vivo en pacientes con alteraciones oculares severas.

#### I.9.3.4. CULTIVO EX VIVO DE CÉLULAS MESENQUIMALES

Las células mesenquimales también se han encontrado en el nicho limbar marcadas por CD-90 y CD-105, y se han analizado con el microscopio confocal HRT III, resultando en una morfología diferente a las células epiteliales, queratocitos, neuronas y células dendríticas (288).

Se sabe que las células mesenquimales aportan por vía paracrina una serie de sustancias que modulan la inflamación a través del TSG6 (*TNF $\alpha$  stimulated gene/protein6*) y además reparan o regeneran el tejidos (289).

El cultivo de células mesenquimales (MSC) nos aporta una serie de ventajas con respecto al trasplante de limbo tradicional (225, 290) (289):

- Son autólogas, pero evitan cirugía en el ojo donante del mismo paciente o de un donante vivo histocompatible.
- Por tanto, no requieren inmunosupresión. Presentan bajos niveles de MHC-I (complejo de histocompatibilidad) y negativos para MHC-II, CD-40, CD-80 y CD-86. Por lo que pueden usarse también células mesenquimales alogénicas sin necesidad de inmunosupresión.
- Además de lo anterior, presentan capacidad inmunomoduladora por lo que controlan la inflamación y evitan el rechazo.
- No hay lista de espera, comparado con el trasplante alogénico cadavérico.
- No hay problema de contaminación ni de contagio infeccioso.

- No hay que extraer las células de su nicho como si hay que hacer en células limbares. Este proceso implica pérdidas celulares y disminución en el rendimiento del cultivo.

- Más económicas en dinero y en tiempo.

- Efecto trófico a través de la regeneración celular, inhibición de la apoptosis, fibrosis e inflamación.

- Integración y diferenciación en los tejidos dañados con efecto “homing”. Este efecto consiste en la migración a áreas del cuerpo con procesos patológicos.

El primer ensayo (Eudra CT 22010-023535-42 PEI 11-130) con éxito de células mesenquimales para tratar IL se ha realizado en España por el grupo de Calonge y cols. En este trabajo se ha demostrado igual o superior eficacia de las células mesenquimales con respecto a cultivo de células limbares salvo en casos severos. Este último punto se postula que ha ocurrido seguramente debido a que el nicho del receptor estaba desestructurado, y sabemos de la importancia para la supervivencia de las células madre de un nicho adecuado. Estas células mesenquimales se extrajeron de la médula ósea y se comparó con trasplante alogénico de células madre con un éxito de supervivencia al año de 85,7% en el grupo de células mesenquimales con respecto al de trasplante alogénico con una supervivencia del 77,8%. Actualmente se conocen 13 estudios con células mesenquimales para el tratamiento de la IL extraídas de médula ósea, 9 de tejido adiposo, 4 de cordón umbilical y 2 de pulpa dental. Llamen la atención, por su fácil accesibilidad, baja morbilidad en la extracción y abundancia de células mesenquimales, sobretudo de las del tejido adiposo denominadas, MSC-ASC. Han demostrado además del efecto *homing*, adherencia tanto al sustrato donde



se vehiculan como al tejido dañado ya que este es uno de los problemas de éstas células y su baja supervivencia cuando son trasplantadas (291).

Oh y colaboradores, han descrito recientemente que el medio de cultivo condicionado por células madre mesenquimales humanas (h-MSc) tiene efecto antiapoptótico y regenerador en células epiteliales progenitoras dañadas en un estudio in vitro. Estos autores refieren que aun queda mucho camino por andar, pero dan los primeros pasos hacia la síntesis de un colirio derivado de cultivos de estas células h-MSc. Uno de los escollos a salvar, será evitar el potencial angiogénico de este cultivo(292). De hecho, se ha demostrado en modelos animales que la administración de estas células en suspensión por vía tópica en gotas y subconjuntival de suspensión, aumentan y ayudan a la curación tras quemaduras corneales severas versus control y más que la vía peritoneal (293).

Por otro lado, y aumentando las el abanico de posibilidades de estas células, Alió del Barrio y colaboradores han descrito recientemente en modelos animales lo que podría ser el primer paso para el desarrollo de una técnica que evite los rechazos de los trasplantes alogénicos usando células mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo, que denomina h-ADASC. En este trabajo se usaron córnea humanas desechadas para trasplante por varias causas, cortarlas en láminas de 90 micras y realizar una descelularizarlas con una técnica descrita por su propio grupo de investigación. Luego cultivaron las h-ADASC en estas láminas y las inyectaron en bolsillos corneales creados en las córneas de conejos. A posteriori se demostró con el análisis histopatológico e inmunohistoquímico repoblación con células que producían *keratocan*, una proteína de los queratocitos humanos y por tanto, eran funcionantes, mantuvieron la transparencia corneal durante 3 meses de seguimiento y no observaron signos de rechazo (294).

## **I.10. SITUACIÓN ACTUAL**

La insuficiencia limbar está aun infradiagnosticada, más aun en estadios iniciales, por lo que se requiere mejorar los sistemas diagnósticos para que sean además de no invasivos, más objetivos y reproducibles. Por ende, también se requiere contar con unos criterios diagnósticos y escalas de severidad apropiadas para clasificar y poder adecuar el tratamiento a cada paciente. Una vez decidamos tratar quirúrgicamente a un paciente con IL con un trasplante de limbo debemos evitar ojos secos severos, controlar previamente la inflamación en la superficie ocular y cualquier problema palpebral. Cuando estos requisitos previos se hayan alcanzado, debemos tener en cuenta que el autotrasplante es la opción con mayor índice de supervivencia del tejido trasplantado, seguida en este orden por el alotrasplante de donante vivo histocompatible y el de donante cadáver.

Por otra parte, el éxito de la expansión ex vivo de cultivos celulares de células de fenotipo limbar aumentará con el mejor conocimiento del medio de cultivo que permita la proliferación y diferenciación de las células madre limbocorneales y otras células progenitoras, preservando su fenotipo indiferenciado. Para ello es indispensable el conocimiento de los marcadores de estas células madre. El conocimiento de marcadores específicos permitiría el aislamiento de estas células madre de forma precisa.

El establecimiento de sistemas de cultivo efectivos y reproducibles para la expansión de células madre limbocorneales es el primer paso para el desarrollo de terapias génicas sobre estas células progenitoras.

Por otro lado, la córnea es el tejido ideal para estudiar las *stem cell*, y con este conocimiento exportarlo a otros tejidos menos accesibles. Esto se debe a que la córnea es transparente, externa y accesible a métodos diagnósticos, incluso no invasivos que permiten

ver estructuras in vivo y estudiarlas en sus diferentes estados. Por otro lado las células madre limbares están separadas de su progenie debido a que estas migran centrípetamente, por lo que se pueden estudiar de forma más aislada.

En nuestro conocimiento, la insuficiencia limbar no se ha estudiado con Pentacam®, ni con el Keratograph 5M®, además de no tener datos sobre el comportamiento de la osmolaridad en esta patología.



# **II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **II.1. JUSTIFICACIÓN**

## **II.2. HIPÓTESIS**

## **II.3. OBJETIVOS**

### **II.1. JUSTIFICACIÓN**

Existen diferentes escalas de severidad y criterios diagnósticos para la Insuficiencia Limbar, pero todos regidos por la observación y exploración clínica que por definición es subjetiva. Es necesario crear criterios diagnósticos fiables y una escala de severidad basada en parámetros objetivos.

La microscopía confocal nos aporta las características mencionadas, permitiéndonos además, el acceso a gran aumento de la anatomía celular y estructural de la córnea, conjuntiva y limbo, de forma no invasiva y sin tener que realizar biopsias, las cuales podrían desencadenar fenómenos inflamatorios y/o cicatriciales que es mejor evitar si es posible en la mayoría de estos pacientes.

Nuestro objetivo, por tanto, es conseguir un diagnóstico de forma objetiva y cuantificar mucho mejor la severidad de cada caso, y ésto, a su vez, nos llevaría a poder tratar mejor a nuestros pacientes con una escala terapéutica acorde a su severidad.

Otra cosa que nos aportaría la microscopía confocal en la insuficiencia limbar es poder diagnosticar dicha enfermedad en estadios precoces donde los síntomas y los signos son escasos, más en oftalmólogos no familiarizados con esta patología.

La microscopía confocal supone un método que aunque relativamente costoso en cuanto a su tecnología, resulta económico en cuanto al costo de cada prueba.

Además, una clasificación más objetiva hará más reproducibles futuros estudios y ensayos clínicos en pacientes afectados de IL.

## **II. 2.HIPÓTESIS**

El análisis de la densidad celular y del plexo nervioso subasal del epitelio corneal mediante la microscopía confocal ayuda al diagnóstico precoz y a clasificar la insuficiencia limbar basándonos en pruebas documentables y de forma no invasiva.

## **II.3. OBJETIVOS**

1. Objetivo principal:

1.1. Analizar y relacionar la presencia de conjuntivalización o pannus (resultado final de la IL) en sus distintos estadios con las demás variables de la exploración. En especial, con la densidad celular del epitelio corneal y de los nervios del plexo nervioso subasal corneal.

2. Objetivos secundarios:

2.1. Analizar la concordancia entre el estadiaje de la insuficiencia limbar basado en los hallazgos de la microscopía confocal y los estadios basados en la escalas de signos y síntomas.

2.2. Comparar los datos obtenidos con sus respectivas medias de la densidad celular (superficiales, alares, basales centrales y basales periféricas) y densidad de nervios de plexo nervioso subasal de personas sanas, con los datos de referencia que se encuentran en la literatura y los valores de nuestros controles.

2.3. Obtener una escala basada en la clasificación confocal de Deng (78), pero aclarando los hallazgos determinantes de cada estadio y añadiendo a dicha

clasificación la presencia o ausencia de plexo nervioso subasal corneal como factor pronóstico.

2.4. Analizar la correlación entre el estadiaje de la insuficiencia limbar basado en los hallazgos de la microscopía confocal, en especial si la presencia de plexo nervioso se relaciona con la variables de las exploraciones clínicas, cuestionario OSDI, VFQ-25, test de Schirmer I, osmolaridad, datos obtenidos con Pentacam® y Keratograph 5M.

2.5. Comparar concordancia de OSDI en formato papel que se le entrega al paciente para autocumplimentación (variable “OSDI papel”) y OSDI entrevistado por un explorador entrenado en el Keratograph 5M (“OSDI K5M”).

2.6. Comparar concordancia de TBUT (“BUT segundos”) con NIKBUT primero del K5M.

2.7. Comprobar si existe relación entre los resultados del test de Schirmer I con la altura de menisco lagrimal del K5M.

2.8. Comprobar si existe relación entre el “enrojecimiento bulbar medio” del K5M y el OSDI.

2.9. Comprobar si existe relación entre la altura del menisco lagrimal, NIKBUT primero, meibografía, OSDI del K5M, “enrojecimiento limbar y temporal” y osmolaridad con respecto al estadiaje confocal de Deng.

2.10. Explorar futuras líneas de investigación a partir de los resultados de esta tesis.





# **III. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS**

## **III.1. FUENTES DE INFORMACIÓN**

## **III.2. TIPO DE ESTUDIO Y PACIENTES**

### **III.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

### **III.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

## **III.3. VARIABLES Y METODOLOGÍA**

### **III.3.1. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS**

### **III.3.2. VARIABLES DE SEGUIMIENTO CLÍNICO**

#### **III.3.2.1. VISITA 1**

#### **III.3.2.2. VISITA 2**

#### **III.3.2.3. VISITA 3**

## **III.4. TAMAÑO MUESTRAL**

## **III.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### **III.5.1. DESCRIPTIVA GENERAL DE LA MUESTRA Y PRINCIPIOS GENERALES DEL ANÁLISIS REALIZADO**

### **III.5.2. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE LA PRESENCIA DE PANNUS CON LAS DEMÁS VARIABLES, EN ESPECIAL CON LA DENSIDAD CELULAR DEL EPITELIO CORNEAL Y NERVIOSA DEL PNSB**

### **III.5.3. CONCORDANCIA DE ESCALAS DE ESTADIAJE**

### **III.5.4. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE DENSIDADES CELULARES Y NERVIOS DEL PLEXO SUBASAL CON LAS REFERIDAS EN LA LITERATURA COMO VALORES NORMALES**

### **III.5.5. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE LA PRESENCIA DE PLEXO NERVIOSO SUBEPITELIAL CON EL RESTO DE VARIABLES**

### **III.5.6. CORRELACIÓN ENTRE OSDI DE AUTOCUMPLIMENTACIÓN Y OSDI DEL K5M INTERROGADO POR EL EXPLORADOR**

### **III.5.7. CONCORDANCIA ENTRE TBUT Y NIKBUT PRIMERO DEL K5M**

### **III.5.8. DESCRIBIR LA RELACIÓN ENTRE SCHIRMER I Y ALTURA DEL MENISCO LAGRIMAL ANALIZADO CON EL K5M**

### **III.5.9. ANALIZAR LA RELACIÓN ENTRE ENROJECIMIENTO BULBAR MEDIO DEL K5M Y OSDI PARA AUTOCUMPLIMENTACIÓN**

### **III.5.10. RELACIÓN ENTRE ALTURA DEL MENISCO LAGRIMAL, ENROJECIMIENTO LIMBAR TEMPORAL Y NASAL, NIKBUT PRIMERO, MEIBOGRAFÍA, OSDI DEL KERATOGRAPH 5M, OSMOLARIDAD CON RESPECTO AL ESTADIAJE CONFOCAL DE DENG**

## **III.6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

## **III.7. ASPECTOS ÉTICOS**

### **III.1.FUENTES DE INFORMACIÓN**

Los datos serán recogidos mediante un cuestionario que se presenta en el Anexo 1 que constará de anamnesis, exploración clínica y una batería de pruebas complementarias realizada a los pacientes, garantizando la protección de los datos personales de los enfermos, según la Ley 15/1999, de 13 de diciembre de Protección de Datos Personales.

El ámbito del proyecto es la Unidad de gestión Clínica de Oftalmología del Hospital Universitario Macarena y Virgen del Rocío (Sevilla), salvo para la realización de la microscopía confocal que se realizó en la Clínica Cartujavisión en Sevilla debido a que en ningún hospital público de Sevilla se dispone de esta tecnología.

### **III.2.TIPO DE ESTUDIO Y PACIENTES**

Estudio de concordancia de pruebas complementarias y evaluación de escalas diagnósticas.

#### **III.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Sujetos mayores de 18 años.
- Pacientes con síntomas y signos compatibles con síndrome de insuficiencia limbar según los criterios clínicos de Dua (21).
- Firma del consentimiento informado .

#### **III.2.2.CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- No tener los requisitos legales para participar en dicho estudio
- No poder completar la anamnesis y la exploración clínica básica.

### **III.3.VARIABLES Y METODOLOGÍA**

#### **III.3.1.DATOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL PACIENTE**

- Edad.
- Sexo.
- Etiología de la insuficiencia linfática según la clasificación del Dr. Gris y Dr. Pérez Santoja (207).

#### **III.3.2.VARIABLES DE SEGUIMIENTO CLÍNICO**

Los pacientes fueron citados tres veces debido a la ubicación de las distintas pruebas que se les realizó. Entre las variables de exploración clínica y sintomatología se incluyeron las mismas variables que incluían las distintas clasificaciones siendo los más fieles posibles a las mismas para luego, poder compararlas.

##### **III.3.2.1.VISITA 1**

A. **Información y consentimiento.** Se le explica al paciente en que consiste el estudio, se le informa de todos los detalles y se le interroga si tiene dudas o preguntas al respecto. Se le explica y entrega el consentimiento informado y hoja de información, entregándoles copia firmada del consentimiento (**ver anexos**).

B. **Anamnesis**

### III. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

1. Interrogar al paciente acerca de la etiología de la IL (causticaciones, pterigium recidivado, intervenciones repetidas, porte prolongado de LC, aniridia, penfigoide ocular cicatricial,...) según clasificación de Gris et al(207).
2. Valorar los síntomas detallados en la escala de López-García(208):
  - a) Se le interroga al paciente sobre episodios de erosión corneal o úlceras recurrentes en los últimos 6 meses.
  - b) Se le interroga al paciente sobre si sufre fotofobia y se le pide que lo gradúe cada ojo por separado: leve, moderada, grave.
  - c) Se le interroga al paciente sobre si sufre epífora y se le pide que lo gradúe cada ojo por separado: leve, moderada y grave

#### C. Exploración clínica:

1. **Agudeza visual mediante optotipo ETDRS a 4 metros** según método validado en el estudio ETDRS (295-297) que siguieron las indicaciones de Bailey y Lovie (298). En el ETDRS, la agudeza visual mejor corregida fue medida con optotipos de agudeza visual logarítmica a una distancia de 4 metros, y a 1 metro si la agudeza visual era peor que 20/100. El protocolo especifica que los examinadores de agudeza visual deben ser entrenados y que sigan los procedimientos estándar para alentar a los pacientes a hacer un esfuerzo máximo para leer tantas letras como sea posible con cada ojo. Las tablas de agudeza visual utilizadas en el ETDRS tenían 14 filas de cinco letras cada una, que corresponde a la agudeza visual de 20/10 a 20/200 cuando se ve a una distancia de 4 metros. Cuando se leen 20 o más letras correctamente a 4 metros (que corresponde a la agudeza visual de 20/100 o mejor), la puntuación de la agudeza

visual será el resultante de las letras correctamente leídas más 30 (el número total de letras en las seis primeras líneas de la carta, que se usarán a una distancia de 1 metro para la medición en pacientes con baja agudeza visual). Cuando se lean menos de 20 letras correctamente a 4 metros, sólo el número de letras leídas correctamente a 4 metros se añadirá a las leídas correctamente de las 6 filas a 1 metro de distancia. Una puntuación perfecta de agudeza visual será de 100, que corresponde a la agudeza visual de 20/10. Si no hay letras leídas correctamente a 1 metro, se registra la presencia o ausencia de percepción de luz, movimientos de manos o cuenta dedos. Se debe poner la mejor graduación obtenida para la toma de agudeza visual, la fecha, nombre del paciente y nombre del examinador.

**2. Presión intraocular mediante tonómetro Perkins calibrado(299).**

**3. Exploración ocular en lámpara de hendidura y fotografía del segmento anterior:**

a) Epitelio: Grados de pannus y alcance corneal del mismo. Principalmente buscando los datos para poder clasificar a cada paciente en una grado u otro de la escala de Schwartz(92), López-García(208), Paolo Rama(209) y clasificación clínica de Deng(78).

(1) Si hay o no pannus.

(2) Cuadrantes horarios corneales afectados.

(3) Grado de invasión corneal por el pannus hacia el ápex corneal en milímetros. Según esto se podía clasificar en invasión corneal menor de 1 milímetro, mayor de 1 milímetro y afectación menor de 180 grados, y por

último, mayor de 1 mm y afectación mayor de 180 grados de la circunferencia limbar.

(4) Si la superficie corneal tiene brillo apagado.

(5) Afectación de córnea central.

b) Valoración con tinción corneal con colirio de fluoresceína (Colircusí Fluoresceína, 20 mg/ml, colirio en solución, Alcon-Cusí, El Masnou, Barcelona, España)

c) **Escala de Oxford** (con colirio de fluoresceína 20 mg/ml mediante fotografías) (300). Esta escala va de 0 a 15 en total, asignando de 0 a 5 puntos en cada área: córnea, conjuntiva bulbar temporal y nasal.

d) **TBUT (*Tear Break Up Time*)**. Se trata del tiempo de ruptura lagrimal (valor numérico) y se ha realizado según técnica de Abelson(301). Se instila en fórnix inferior colirio de fluoresceína al 2% y se espera 10 a 30 segundos. Valores menores o iguales a 10 segundos son patológicos.

4. **OSDI y VFQ 25**. Se le entregan al paciente dichos cuestionarios y se le instruye para rellenarlo. Principalmente se leen unas breves instrucciones que acompañan al cuestionario VFQ-25 de autocumplimentación como por ejemplo, que debe contestar a las preguntas asumiendo la mejor visión posible con ambos ojos y con corrección. En este tiempo se produce lavado de tinción de fluoresceína, que osciló entre 35-45 minutos (**Ver anexos**).

a) **Ocular Surface Disease Index (OSDI)**(189).

b) **Visual Function Questionnaire (VFQ 25)** del National Eye Institute es la última modificación de otra encuesta más extensa que tenía 51 preguntas llamada *51-item National Eye Institute Visual Function Questionnaire NEI-VFQ* (302, 303). Existe dos versiones: una versión de autocumplimentación que es la que hemos usado y otra versión con entrevistador. Dicha encuesta nace con el propósito de medir el estado de salud visual referida por el paciente en enfermedades crónicas del ojo. La última versión (V2000) que es la que usamos aquí contiene 26 preguntas aunque sólo 25 están midiendo el estado visual. Es una encuesta gratuita y se puede descargar de *RAND Corporation* (Santa Mónica, California, USA) en [http://www.rand.org/health/surveys\\_tools/vfq.html](http://www.rand.org/health/surveys_tools/vfq.html). Existe una versión en español pero deja claro en la misma página web que no se ha traducido por RAND, que no tiene certificado de traducción necesario para cualquier encuesta escrita en otro idioma y por tanto no está validada. Debido a que la encuesta no tenía esos requisitos, tenía muchos vocablos latinoamericanos que no entendían los pacientes y carecían de alguna pregunta con respecto a la versión anglosajona, se decidió traducirlo lo más fielmente posible al castellano para su uso en este trabajo. Esta escala mide la influencia de la discapacidad visual y los síntomas visuales en la salud general, el estado emocional, grado de afectación en las actividades diarias y en el ambiente social. Las preguntas además están subdivididas en diferentes grupos según valore el estado visual general, dificultada en las actividades en visión próxima y visión lejana, limitación en la función social debida a la visión, limitaciones de desempeño del trabajo, dependencia a otras personas, síntomas mentales debido a la discapacidad, dificultad al conducir,



limitaciones en la visión periférica y en los colores, y dolor ocular. Además cuenta con una pregunta sobre salud general. Por otro lado cuenta con un apéndice para profundizar en determinadas áreas que también se les ha pasado a los pacientes.

5. Tras ésto se prosigue valoración con **tinción de Verde de Lisamina** (colirio 1% verde de lisamina sin conservantes, Farmacia La Botica de Argensola, Madrid)

6. **Escala de Van Bijsterveld.** Se realiza con tinción con colirio Verde de Lisamina descrito anteriormente y mediante fotografías (304, 305). Esta escala va de 0 a 9 en total, asignando de 0 a 3 puntos en cada área: córnea, conjuntiva bulbar temporal y nasal.

7. **Test de Schirmer I** sin anestesia según técnica descrita por Farris R.L. (306) (valor numérico). Valores por debajo de 10 mm se consideran patológicos.

D. **Pentacam®.** Exploración con el analizador de cámara anterior mediante tecnología Scheimpflug Pentacam estándar (Pentacam Scheimpflug Imaging System, Oculus, Wetzlar, Alemania)(307). Este aparato fue calibrado justo antes de empezar los análisis de los pacientes dentro de su mantenimiento normal anual. De esta exploración se tomaron los siguientes datos:

1. RMS (*Root Mean Square*, media cuadrática) de las aberraciones de alto orden (*High order aberrations*, HOA) y de bajo orden (*Low order aberrations*, LOA) en el máximo diámetro que permitía (10 mm) y llegando hasta nivel 8 de la pirámide de Zernike (308) .

2. Con estos parámetros se obtuvo la Q (asfericidad corneal) media, y la Q en cuadrantes nasal, temporal, superior e inferior.
3. Volumen corneal en mm<sup>3</sup> a 10 mm.
4. Paquimetría (grosor corneal) en la zona más fina en  $\mu\text{m}$ .

#### III.3.2.2. VISITA 2

A. **Osmolárimetro TearLab (figura 20).** Este aparato valora la osmolaridad lagrimal. La osmolaridad es un parámetro muy valioso en el síndrome del ojo seco (309, 310). No hemos encontrado literatura sobre el comportamiento de la osmolaridad en la insuficiencia de limbo. En nuestro trabajo la osmolaridad se midió en el mismo lugar, con iluminación fija y no regulable



**FIGURA 20. OSMOLARÍMETRO TEARLAB**

mediante luces fluorescentes. Se mantuvo la temperatura a 24°C en una habitación termocontrolada y se registró la humedad relativa, situándose entre 55 y 60 % rel. Siempre se realizó en primer lugar antes de empezar con el resto de exploraciones y con un mínimo de 8 h antes sin ningún tratamiento tópico ocular. Por este motivo y para evitar la fluctuación normal que ocurre durante el día de la osmolaridad evitando falsos positivos, se les realizó de 9 a 11 de la mañana a todos los pacientes (311, 312). Se anotaron dichos parámetros al empezar con cada paciente. Estos

parámetros se midieron con el termohigrómetro analógico *TFA 20.1028.05 Domatoca* (TFA Dostmann GmbH + Co. KG, Wertheim-Reicholzheim, Alemania). Antes de cada sesión se calibraba el osmolarímetro TearLab® según las instrucciones indicadas en el manual de instrucciones del mismo aparato. En el mango para tomar la muestra se colocaba una tira de un sólo uso para cada ojo y se tomaba muestra del menisco lagrimal en zona temporal inferior sin tocar el párpado ni la superficie conjuntival, mediante capilaridad. Se necesitan sólo 50 nl de lágrima aunque el mismo aparato avisa cuando tiene la cantidad requerida. Una vez tomada la muestra, el mango de recogida se inserta en el banco de soporte donde tras sincronizar el código de las tiras de recogida con el del soporte se procede al cálculo de la osmolaridad que es debidamente recogida en el cuaderno de recogida de datos.

B. **Keratograph 5M** (Oculus, Wetzlar, Alemania). Se analizaron en nuestros pacientes los siguientes parámetros (**figura 12 y 13**):

#### C. OCULUS TF-Scan

1. **Altura del menisco lagrimal.** Mediante fotografía y medición con el software que incorpora un calibrador se sitúan los puntos y el software te da la distancia entre dos puntos. Se midió en tres puntos por cada ojo: zona media, nasal y temporal. Posteriormente se hallaba la media aritmética de las medidas.

2. **NIK BUT** (Non Invasive Keratograph Break-Up Time). Tiempo de ruptura lagrimal de forma no invasiva según la disrupción del reflejo de las miras en la película lagrimal. El keratograph 5M® nos aporta el NIK BUT primero, medio y el nivel de ojo seco según el NIK BUT. De éstos, usamos principalmente el NIK BUT primero porque es el que se asemeja más al TBUT original.

**D. OCULUS Meibo-Scan**

1. Meibografía de los párpados superior e inferior.
2. Visualización 3D de las glándulas de Meibomio.

**E. OCULUS R-Scan**

1. Detección y clasificación automática de la enrojecimiento<sup>4</sup>, midiendo el enrojecimiento limbar temporal y nasal, enrojecimiento bulbar nasal y temporal, enrojecimiento medio bulbar y el área analizada.

**III.3.2.3.VISITA 3**

**A. Microscopía confocal in vivo HRT II-RCM®** (Heidelberg Retina Tomograph II con el módulo *Rostock Cornea*, **figura 21**). Se ensambla el módulo de córnea en el HRT-II, colocando el enfoque en  $\pm 12$ , para posteriormente colocar el TomoCap© en la parte anterior de la lente del módulo de córnea. Este es un fungible de plástico de un sólo uso que se coloca anterior a la lente del módulo Rostock a



**FIGURA 21. MICROSCOPIO CONFOCAL HRT II**

<sup>4</sup> El K5M denomina a esta medida, enrojecimiento pero es hiperemia. en próximas mejoras se corregirá.

modo de protección ya que este microscopio confocal aplana la córnea. Se pone gel, Viscotears® normalmente, por dentro y fuera del TomoCap® para mantener la interfase óptica. Para minimizar la posibilidad de contaminación entre pacientes, se desinfecta la lente con alcohol de isopropilo antes y después de cada uso, previamente a poner el TomoCap. El paciente se sienta en una silla detrás del instrumento y se le explica al paciente en qué consiste el examen. Se le explica que no es dolorosa y que debe colaborar mirando donde le vayamos indicando. Se instila una gota de anestésico local (Colircusí Anestésico Doble®, Oxibuprocaina hidrocloreto 4 mg/ml y Tetracaína hidrocloreto 1 mg/ml, colirio en solución) en ambos ojos (**Figura 22**). La cabeza del paciente se sitúa entre la mentonera y la barra frontal, y después la altura total se ajusta para obtener la máxima comodidad posible (**Figura 21**). Se introducen los datos del paciente, se enfoca sobre la superficie del TomoCap tomando como punto de partida la imagen de



**FIGURA 22. MATERIAL NECESARIO PARA REALIZAR UNA MICROSCOPIA CONFOCAL**

un “punto blanco” que aparece en la pantalla y se sitúa en cero la posición de la paquimetría (punto neutro). A continuación se selecciona en el ordenador el tipo de imagen (córnea o retina) que se desea adquirir. En nuestro caso, se tomaron imágenes en dos dimensiones de 384 por 384 píxeles con 400 por 400  $\mu\text{m}$  de campo de visión.

Existen tres modos para la adquisición de imágenes:

- (1) *Secciones*: Imágenes individuales bidimensionales.
- (2) *Volúmenes o z-scan*: 40 imágenes bidimensionales tomadas en un rango de 80  $\mu\text{m}$  de profundidad (una imagen cada 2  $\mu\text{m}$ ), que pueden ser visualizadas como fotogramas individuales o como secuencia de fotogramas (vídeo). El tiempo de adquisición de cada serie es de 6 seg (cada imagen individual en 0,024 seg).
- (3) *Secuencia*: 30 imágenes en un mismo plano a la misma profundidad corneal. Las imágenes pueden ser también visualizadas como vídeo o como imágenes individuales.

De éstos, se usó principalmente el modo sección, y de la zona central, inferior y superior uno o varios volúmenes. Si existía vascularización corneal se tomaban secuencias para analizar si existía circulación y visualizar mejor los vasos.

Prosiguiendo con la prueba, se le coloca al paciente un blefarostato para evitar el parpadeo y se le instruye al paciente para fijar en un punto. El paciente mantiene la fijación en un punto externo, lo que permite centrar el ojo y el módulo gracias al reflejo del haz del láser. El mismo aparato tiene un proyector de luz para fijación externa, está anclado en el brazo de apoyo de la cabeza para que con dicha luz dirija la mirada. Esta fijación es válida para explorar córnea central, pero no es muy útil cuando queremos explorar zonas más periféricas como el limbo. Por ello, se desarrolló una presentación para una tableta digital que mediante diferentes secuencias de puntos centelleantes en fondo negro y en diferentes posiciones se dirigía la mirada del ojo contralateral al explorado y así facilitarnos la exploración.

La colocación en el aparato fue con un brazo articulado. La presentación mediante una aplicación era ejecutable y administrable desde otro dispositivo digital por lo que se podía controlar externamente. Al realizar unas primeras pruebas vimos que al estar tan cerca del ojo, el esfuerzo acomodativo implicaba una sinergia de convergencia ocular que implicaba la incorrecta alineación del ojo por lo que tuvimos que recurrir a instruir al paciente a mirar en puntos más lejanos de la habitación, en la pared que había frente al paciente, para poder explorar el limbo.

Por último, tras visualizar lo que denominamos “punto blanco”, que aparece en la zona central de la pantalla y nos indica que está en posición neutra, se acerca el aparato hasta que el TomoCap® contacte con el vértice corneal. La lente objetivo contacta con la córnea ya anestesiada a través del gel de Viscotears®. Una vez contacta, en el monitor del ordenador se muestran imágenes en tiempo real. Se sitúa el objetivo totalmente perpendicular a la córnea consiguiéndose una imagen completa en el monitor. Si la orientación no es totalmente perpendicular, parte de la imagen no aparece, se observa un corte perpendicular u oblicuo del epitelio corneal. Mediante el ajuste antero-posterior se localiza el plano focal correspondiente a la capa de células que se desea medir, empezando desde la superficie. Se debe tener cuidado de no ejercer excesiva presión para evitar la formación de pliegues y mantener la integridad corneal, aunque es inevitable aplanarla ligeramente. Siendo una prueba de contacto y con alta magnificación, la colaboración del paciente es imprescindible.

B. **Estadía**je (según Deng SX)(78). Tras el análisis con **microscopía confocal** se realiza análisis de las imágenes que conlleva:

1. Análisis de las células según los parámetros marcados en el artículo de Deng(78).
2. Contaje de células basales centrales y periféricas, alares y superficiales con el mismo software que proporciona el Microscopio Confocal HRT II.
3. Recuento de plexo nervioso subasal tras exportar imágenes de confocal en formato “jpg” y usando el software *Image J* junto con el *plugin Neuron J*. Se debe instalar el software *image J* -es gratuito- desde la página <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html> (313, 314). Luego el plugin *Neuron J* <http://www.imagescience.org/meijering/software/neuronj/> (315, 316). Se reinicia el programa, para que el *plugin* funcione con el programa *Image J*. Existen *tutoriales* del *Image J*, pero el único que encontramos del *neuron J* es muy básico y por supuesto no informa de como medir la densidad de nervios. Por ello, se solicitó ayuda de un Ingeniero Industrial que nos explicó su manejo. Se corta la imagen para descartar la etiqueta con los datos del paciente y se deja sólo la imagen con un tamaño conocido de 400 por 400 micras. Se señalan los tramos nerviosos que se distinguen por su morfología, de color blanco sobre fondo gris oscuro, luego se analiza y mediante un proceso matemático nos da el valor en  $\mu\text{m}$  de longitud de nervios por área ( $\text{mm}^2$ ) que es como aparecen en la mayoría de las publicaciones. También se puede valorar su estructura, uniones, ramificaciones, morfología y dirección.
4. Exploración de las empalizadas y criptas limbares en cuatro puntos: superior, inferior, nasal y temporal, junto con el búsqueda de células caliciformes en la superficie corneal.



### **III.4. TAMAÑO MUESTRAL.**

El tamaño muestral ha sido determinado según los diferentes objetivos.

Para la comparación de medias en dos muestras independientes (muestras provenientes de la subdivisión realizada por el criterio de pannus mayor de 180° limbares y más de 1 mm de avance corneal), se usó el método “test de Satterthwaite para varianzas y tamaños muestrales desiguales” del programa para “Cálculo de Tamaño Muestral” *nQuery Advisor Release 7.0* (Statistical Solutions, Broadway, Saugus, Massachusetts, U.S.A., 2002), y la información proporcionada por muestras pilotos.

Dado la complejidad de obtener pacientes que cumplieran la condición de pannus mayor de 180° limbares y más de 1 mm de avance corneal, ya que se trata del estadio más avanzado, planificamos la determinación del tamaño de muestra para el estudio de la variable densidad de nervios del plexo subasal mediante confocal con tamaños de grupos desiguales. Para detectar una diferencia de al menos 3000  $\mu\text{m}/\text{mm}^2$  de la variable densidad de nervios del plexo subasal mediante confocal entre pacientes con pannus mayor de 180° limbares y más de 1 mm de avance corneal o menor que esta afectación, desviaciones típicas de 1100 y 6500  $\mu\text{m}/\text{mm}^2$  en sendos grupos (obtenidas de un estudio piloto realizado por nosotros), un error  $\alpha$  del 5% y un error  $\beta$  del 20% (potencia del 80%) necesitamos 15 y 42 ojos, respectivamente.

El tamaño muestral fue determinado también con el fin de estimar el coeficiente de correlación intraclase, como una medida de la fiabilidad entre mediciones realizadas por diferentes métodos a los mismos sujetos. Para el cálculo de dicho tamaño asumimos un valor esperado del coeficiente de correlación intraclase de 0,6 en la situación más desfavorable (obtenido de una experiencia previa), un nivel de confianza del 95%, una

precisión o amplitud del intervalo de 0,15 y la realización de 2 métodos de medidas. Con toda esta información necesitamos al menos 71 ojos.

Para el estudio de las relaciones entre pruebas que medían magnitudes diferentes en unidades distintas, como fue en la comparativa entre OSDI y enrojecimiento bulbar, y entre la altura del menisco lagrimal y Schirmer I, determinamos los coeficientes de correlación lineal de Pearson para lo cual determinamos el tamaño muestral necesario usando el valor esperado 0,47 de este coeficiente obtenido a partir de un estudio previo, un valor de  $\alpha$  del 5% y una potencia  $1-\beta$  del 80%. Con estos datos resultó un tamaño mínimo para ejecutar el estudio de 30 ojos.

Para el cálculo del tamaño muestral se ha utilizado el programa *nQuery Advisor Release 7.0* (Statistical Solutions, Broadway, Saugus, Massachusetts, U.S.A., 2002).

## **III.5. ANALISIS ESTADÍSTICO**

### **III.5.1. DESCRIPTIVA GENERAL DE LA MUESTRA Y PRINCIPIOS GENERALES DEL ANÁLISIS REALIZADO**

El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 22.0 para Windows. Se realizó dicho análisis en el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Sevilla.

El análisis descriptivo de los datos se realizó mediante porcentajes para las variables cualitativas. En cuanto a las variables cuantitativas se resumieron con medias y desviaciones típicas, o bien con medianas y percentiles P25 y P75 en caso de distribuciones marcadamente asimétricas.

Para relacionar dos variables cualitativas se realizó tablas de contingencia y se utilizó la prueba Chi-Cuadrado o bien, los métodos no asintóticos de Montecarlo y prueba Exacta.

Para la comparación de variables numéricas entre los dos grupos se aplicó la prueba paramétrica de la t-Student para muestras independientes, o en su defecto la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney en caso de distribuciones no normales. En el caso que se obtuvieron diferencias significativas, se hallaron intervalos de confianza al 95% para diferencias de medias o medianas (estimación de intervalos de confianza de Hodges-Lehman).

### **III.5.2. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE LA PRESENCIA DE PANNUS CON LAS DEMÁS VARIABLES, EN ESPECIAL CON LA DENSIDAD CELULAR DEL EPITELIO CORNEAL Y DENSIDAD DEL PLEXO NERVIOSO SUBASAL**

Para ello se dividió la muestra mediante tres criterios según afectación en sectores horarios e invasión hacia el centro corneal en diferentes grupos. Con esto queríamos estudiar

el efecto que tenía sobre las variables de estudio, grados crecientes de pannus, desde la mínima presencia de pannus hasta afectación mayor de 180° y más un milímetro de invasión corneal (**tabla 10**).

Tabla 10.Criterios de subdivisión de pannus para analizar el comportamiento de las variables estudiadas

GRADO DE PANNUS	GRUPO 1	GRUPO 2
PANNUS	PANNUS	NO PANNUS
CUADRANTE	<3H PANNUS	≥3H PANNUS
MEDIA CÓRNEA Y <1MM	>1MM Y <180°	<1 MM Y ≥180°

El primer criterio utilizado para la división en dos grupos fue la presencia de pannus (dicotómica, si o no). Tomando esta variable como dependiente se analizaron las demás variables independientes a fin de valorar su relación. El procedimiento seguido para buscar la relación entre dos variables cualitativas fue primero, crear unas tablas de contingencia y se utilizó posteriormente, la prueba Chi-Cuadrado o bien, los métodos no asintóticos de Montecarlo y prueba Exacta. La Chi cuadrado de Pearson se usó si el porcentaje de casillas que tienen un recuento menor que 5 es menor del 25% y el recuento mínimo esperado es mayor o igual a uno. Si esto no se cumple en alguno de estos dos criterios se usó el Método de Monte Carlo. Para la comparación de variables numéricas entre los dos grupos (variable cualitativa dicotómica) se aplicará la prueba paramétrica de la t-Student para muestras

independientes, o en su defecto la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney en caso de distribuciones no normales (**tabla 10**).

El segundo criterio, dividió la población en pannus con afectación de menos de 3 sectores horarios y el resto, mayor o igual a 3 sectores horarios. Se analizó de la misma forma que el punto anterior, la relación entre las variables (**tabla 10**).

Mediante el tercer y último criterio se compararon un grupo que cumplía tener pannus mayor de 1 mm de invasión corneal y afectación mayor o igual a 180 grados de la circunferencia limbar, con el otro grupo, con menor afectación tanto en grados de afectación limbar como en avance de invasión corneal (**tabla 10**).

Con el objetivo de estudiar la influencia de la densidad de células basales centrales y la densidad del plexo nervioso subasal corneal, que consideramos potencialmente como predictoras de pannus en estadio avanzado, que consideramos afectación mayor o igual a 180 grados limbares y mayor de 1 mm de avance corneal, realizamos un modelo de regresión logística binaria. El modelo se construyó mediante un método de introducción directa de variables no automatizado. Para las variables incluidas en el modelo, el método calcula sus *odds ratio* individuales y sus respectivos intervalos de confianza al 95%. El grado de fiabilidad del modelo se midió con el índice de Hosmer-Lemeshow.

#### III.5.3. CONCORDANCIA DE ESCALAS DE ESTADIAJE

La concordancia de los estadios clínico de Deng, López-García y Paolo Rama comparados con el de Confocal de Deng se hizo con el índice kappa. Este se trata de un coeficiente de concordancia, en el cual la significación menor de 0,05 indica que el coeficiente es distinto de cero en la población. Ahora bien, el coeficiente kappa mide el grado de concordancia, y no es suficiente que este coeficiente sea distinto de cero para que

se pueda hablar de concordancia entre técnicas, observadores, etc. Por ello, Landis y Koch propusieron unos márgenes para valorar el grado de acuerdo en función del índice kappa y los grados de acuerdo aumentan de 0, ningún acuerdo hasta 1, máximo acuerdo (**tabla 11**).

Tabla 11.Índice de concordancia Kappa.

KAPPA	GRADO DE ACUERDO
<0	SIN ACUERDO
0-0,2	INSIGNIFICANTE
0,2-0,4	BAJO
0,4-0,6	MODERADO
0,6-0,8	BUENO
0,8-1	MUY BUENO

#### III.5.4. COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE DENSIDADES CELULARES Y NERVIOS DEL PLEXO SUBASAL CON LAS REFERIDAS EN LA LITERATURA COMO VALORES NORMALES Y CONTROLES SANOS

Analizamos la diferencia de las medias o medianas de nuestra muestra de pacientes con IL con respecto a los datos descritos sobre densidad celular epitelial corneal y de nervios del plexo nervioso subasal corneal en población sana. Por otro lado, también se comparó con los datos obtenidos de los controles de nuestra muestra.

Para este fin, se procedió primero a realizar un test de normalidad para las densidades celulares y para la de nervios del plexo subasal corneal de nuestra muestra. Para las variables que fueron normales se usó la media y se analizó mediante t de student de una sola muestra comparándose con el valor medio aportado por la literatura de referencia en pacientes sanos. Por el contrario, las densidades en las que su distribución no fue normal estadísticamente, se usó la mediana y se aplicó un test no paramétrico de Wilcoxon. Se realizó cada prueba por cada densidad celular o de nervios expresada en la literatura por separado. Entre los trabajos que se usaron para comparar, se utilizó el primer trabajo que informa sobre las densidades celulares y el de mayor tamaño muestral, en nuestro conocimiento. El primer caso describía densidades celulares obtenidas con un tipo de microscopio confocal (microscopio confocal slit-scanning) distinto al usado en nuestro trabajo (microscopio confocal laser-scanning) por lo que los comparamos para ver densidades obtenidas con distintos microscopios (Mustonen 1998)(103). Por otro lado, el de mayor tamaño muestral usó el mismo tipo de microscopio confocal que en nuestro trabajo (Eckard 2006) (102).

En el caso de la densidad de nervios del plexo subasal, debido a los distintos criterios para medir los nervios y la gran diferencia según los distintos microscopios confocales se eligieron los últimos trabajos sobre densidades de nervios (Niederer y Lagali en 2013). Además el trabajo de Niederer et al. ha sido el de mayor tamaño muestral (207) en sujetos sanos hasta la fecha y en nuestro conocimiento.

#### **III.5.5. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE LA PRESENCIA DE PLEXO NERVIOSO SUBEPITELIAL CON EL RESTO DE VARIABLES**

Para ello se creó un estadiaje a partir del estadiaje confocal de Deng que contiene tres estadios, I, II, y III, y se le añadió una nueva variable: tener o no plexo nervioso subasal

corneal mediante confocal. Si tenía plexo nervioso observado con confocal, era etiquetado cualquiera de los estadios con la letra “A” y si no se observaba plexo nervioso en confocal se etiquetaba con la letra “B”. Se agruparon los pacientes con plexo nervioso, es decir, la categoría A, en un grupo y los que no tenían, grupo B. Se analizaron las distintas variables entre ambos grupos. El procedimiento estadístico para analizar las distintas variables fue el mismo descrito anteriormente.

#### **III.5.6. CORRELACIÓN ENTRE OSDI DE AUTOCUMPLIMENTACIÓN Y OSDI DEL K5M INTERROGADO POR EL EXPLORADOR**

Se analizaron las medias de ambos tests a fin de ver si eran distintas. Luego tras comprobar que no había diferencias estadísticamente significativas, se aplicó un coeficiente de relación intraclase y a fin de ver la dispersión de los datos se generó una curva de Bland-Altman.

#### **III.5.7. CONCORDANCIA ENTRE TBUT Y NIKBUT PRIMERO DEL K5M**

El análisis de este apartado es similar al del apartado anterior.

#### **III.5.8. DESCRIBIR LA RELACIÓN ENTRE SCHIRMER I Y ALTURA DEL MENISCO LAGRIMAL ANALIZADO CON EL K5M**

Se realizó un coeficiente de correlación de Pearson (simbolizado para una muestra con la letra “r”) para analizar si existe relación entre ambas medidas que no usan la misma unidad ni miden la misma magnitud. Se usa el coeficiente de correlación de Pearson, ya que a diferencia de la covarianza, este coeficiente es independiente de la escala de medida de las variables.

- Si  $0 < r < 1$ , existe correlación positiva



- Si  $r=0$ , no existe relación lineal. Pueden existir relación entre estas variables pero no de forma lineal.
- Si  $-1 < r < 0$ , existe una correlación negativa.
- Si  $r = -1$ , relación inversa o correlación negativa perfecta.

### **III.5.9. ANALIZAR LA RELACIÓN ENTRE ENROJECIMIENTO BULBAR MEDIO DEL K5M Y OSDI PARA AUTOCUMPLIMENTACIÓN**

Se analizó del mismo modo y por los mismos motivos que el punto anterior, con el coeficiente de correlación de Pearson.

### **III.5.10. RELACIÓN ENTRE ALTURA DEL MENISCO LAGRIMAL, ENROJECIMIENTO LIMBAR TEMPORAL Y NASAL, NIKBUT PRIMERO, MEIBOGRAFÍA, OSDI DEL KERATOGRAPH 5M Y OSMOLARIDAD CON RESPECTO AL ESTADIAJE CONFOCAL DE DENG**

Se dispusieron en distintos tipos de gráficos las medias de estas variables obtenidas con el keratograph 5M®: altura del menisco lagrimal, NIKBUT primero y medio, grados de disminución de glándulas de Meibomio en la meibografía, OSDI y además, la osmolaridad medida con el TearLab®, con respecto al estadiaje confocal de Deng. Se analizó si existían diferencias estadísticamente significativas entre estas variables cuando se distribuían en los distintos estadios confocal de Deng.

### **III.6.LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

Esta enfermedad es relativamente difícil de diagnosticar en estadios precoces, incluso por oftalmólogos familiarizados con dicha patología. Además las pruebas para poder confirmar dicha enfermedad son caras, por tanto poco accesibles desde el ámbito público. En estadios más avanzados son más fáciles de diagnosticar pero debido a la masificación de consultas, el desconocimiento general de esta patología y el encubrimiento de dicha patología con otras más prevalentes hacen que se infradiagnostique dicha patología pareciendo que es menos prevalente de lo que es y siendo más difícil reclutar pacientes y obtener datos fiables de prevalencia y causalidad reales.

### **III.7. ASPECTOS ÉTICOS**

Se obtuvo la aprobación por el Comité de Ética del Hospital Macarena (anexo 7) y se entregó a los pacientes una hoja informativa después de informar de las características del estudio. Tras esto, se confirmó la conformidad de entrar en el estudio con la firma por duplicado del consentimiento informado.

Los participantes en el estudio se comprometieron a respetar los principios fundamentales recogidos en la Declaración de Helsinki, el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y a la Biomedicina.

A los datos de los pacientes incluidos en el estudio tendrán acceso únicamente los investigadores del estudio, en aras de garantizar su confidencialidad y tal como se especifica en el Consentimiento Informado (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y Ley 41/2002, de 14 de Noviembre básica reguladora de la

Autonomía del Paciente y de Derechos y Obligaciones en Materia de Información y Documentación Clínica).



# **IV. RESULTADOS**

## **IV.1. DESCRIPTIVA DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA**

## **IV.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE LA PRESENCIA DE PANNUS CON LAS DEMÁS VARIABLES, EN ESPECIAL CON LA DENSIDAD CELULAR DEL EPITELIO CORNEAL Y NERVIOSA DEL PNSB**

## **IV.3. CONCORDANCIA DE ESCALAS DE ESTADIAJE**

## **IV.4. RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DE MEDIAS DE DENSIDADES CELULARES Y NERVIOS DEL PLEXO SUBASAL CON LAS REFERIDAS EN LA LITERATURA COMO VALORES NORMALES Y CON LAS DE LOS CONTROLES**

## **IV.5. RELACIÓN DE LA PRESENCIA(A) O AUSENCIA(B) DEL PLEXO NERVIOSO SUBASAL CON EL RESTO DE VARIABLES DE NUESTRA EXPLORACIÓN**

## **IV.6. CORRELACIÓN ENTRE OSDI DE AUTOCUMPLIMENTACIÓN Y OSDI DEL K5M INTERROGADO POR EL EXPLORADOR**

## **IV.7. CONCORDANCIA ENTRE TBUT Y NIKBUT PRIMERO DEL K5M**

## **IV.8. RELACIÓN ENTRE SCHIRMER I Y ALTURA DEL MENISCO LAGRIMAL ANALIZADO CON EL K5M**

## **IV.9. ANALIZAR LA RELACIÓN ENTRE ENROJECIMIENTO BULBAR MEDIO DEL K5M Y OSDI PARA AUTOCUMPLIMENTACIÓN**

## **IV.10. RELACIÓN ENTRE ALTURA DEL MENISCO LAGRIMAL, ENROJECIMIENTO LIMBAR TEMPORAL Y NASAL, NIKBUT PRIMERO, MEIBOGRAFÍA, OSDI DEL KERATOGRAPH 5M, OSMOLARIDAD CON RESPECTO AL ESTADIAJE CONFOCAL DE DENG**

## **IV.1. DESCRIPTIVA DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA**

Se estudiaron 97 ojos de 49 pacientes, de los cuales 12 ojos actuaron como control en patologías unilaterales. Del total de pacientes, 28 eran mujeres (57,1%) y 21 hombres (42,9%). A 25 pacientes se les realizó microscopía confocal. De éstos, se estudiaron 49 ojos, debido a que a un paciente se le realizó microscopía confocal en un ojo, pero cuando el paciente se le iba a realizar en el siguiente ojo refirió molestias y visión borrosa y no se pudo continuar con el ojo contralateral. De éstos 49 ojos estudiados con confocal, 44 eran casos y 5 controles sanos. No se pudo realizar microscopía confocal en 6 pacientes por intolerancia al blefarostato, anquilobléfaron, por problemas anatómicos de los párpados o estado crítico ocular. Cuatro pacientes no acudieron por mal estado general, 3 sufrieron fracturas (cadera, codo y hombro) y una paciente tenía mal estado general. El resto de pacientes, 14 pacientes rehusaron o no pudieron acudir a esta última prueba: algunos no acudieron a la cita -se les citaba hasta en dos ocasiones si no podían acudir a la primera-, otros rehusaron por problemas de transporte, dos estaban fuera por motivos laborales o de ocio y uno no se le pudo localizar por problemas administrativos. A todos los pacientes se les analizó con el Pentacam®, aunque en 20 ojos no obtuvimos resultados evaluables. A 38 pacientes (76 ojos) se les analizó con el K5M y se le midió la osmolaridad. Hay que reseñar que estas tres últimas pruebas no necesitan blefarostato y son de no contacto, por lo que varios de los pacientes que no pudieron realizarse la confocal por problemas anatómicos parpebrales, si se les pudo realizar estas pruebas.

Para analizar la etiología ver **tabla 12 y figura 23**. Respecto a la lateralidad, se analizaron 50 ojos derechos y 47 izquierdos. La edad media<sup>5</sup> fue de 54,63(19,9) años con un

---

<sup>5</sup> Cuando se anoten medias se pondrá entre paréntesis la desviación estándar de esta forma:  $X(DE)$

Tabla 12. Causas de la IL en nuestro estudio expresado en porcentajes

ETIOLOGÍA	Porcentaje del total de
Inflamaciones crónicas y severas de la conjuntiva	26,8
Enfermedad injerto contra huésped (EICH)	12,4
Quemadura térmica o química	11,3
Queratitis neurotrófica	7,2
Iatrogénica por toxicidad, cirugías o quimioterapia	6,2
Pterigium recidivante	4,1
Porte prolongado de lentes de contacto (anoxia)	4,1
Queratitis infecciosas severas	3,1
Sd. Lyell	2,1
Sin filiar	10,3
Penfigoide ocular cicatricial (14,4%)	
Rosácea ocular(6,2%)	
Sd. Ojo seco severo(4,1%)	
Queratoconjuntivitis atópica(2,1%)	

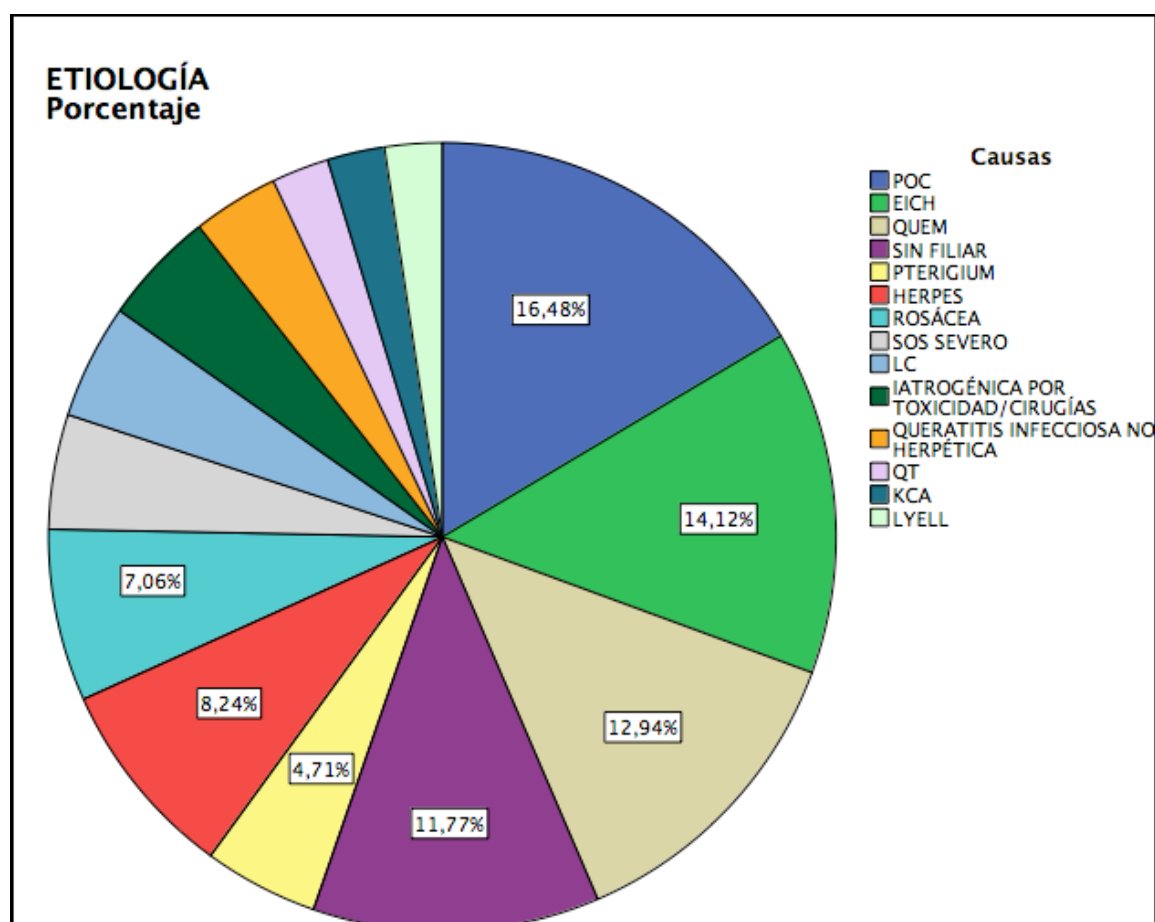


FIGURA 23. GRÁFICO DE SECTORES SOBRE LA ETIOLOGÍA DE LA IL EN NUESTRA MUESTRA

mínimo de 18 años y un máximo de 91 años. En los datos recogidos con el Pentacam® a 10 mm de diámetro y con el máximo grado de Zernike que nos permite el Pentacam®(N=8) se obtuvieron valores expresado en medianas<sup>6</sup>(**tabla 13**). En la **tabla 13** se resume la descriptiva general separando por casos y controles de las principales variables.

En la **tabla 14** se exponen los resultados de las dos encuestas realizadas que por ser por paciente, es decir valorando los dos ojos no se pueden separar por casos y controles ya que nuestros controles son los ojos sanos contralaterales de los enfermos en IL unilaterales.

**Tabla 14.Resultados de la encuesta VFQ 25 y OSDI**

OSDI		47,5(25,8)
OSDI K5M		47,3(27,5)
VFQ 25	TOTAL	77,1(56,4-86,2)
	SALUD GENERAL	73,9(17,7)
	VISIÓN GENERAL	58,6(21,9)
	VISIÓN CERCANA	83,3(58,3-100)
	VISIÓN LEJANA	91,6(70,8-100)
	FUNCIÓN SOCIAL	100(100-100)
	LIMITACIONES DE ROL	87,5(68,75-100)
	BIENESTAR/SOCORRO	88,2(26,7)
	DEPENDENCIA	100(100-100)
	CONDUCCIÓN	52,4(40,5)

<sup>6</sup> Cuando nos refiramos a mediana entre paréntesis se pondrá percentil 25 y percentil 75: *Me (P25, P75)*



Tabla 13. Descriptiva general de nuestra muestra

VARIABLES		CASOS (N=85)	CONTROLES (N=12)	Significación estadística
EDAD		55,1 (19,6)	48,7 (20,1)	0,298
SEXO VARÓN		40%	66,7%	0,081
LATERALIDAD (OD)		50,6%	58,3%	0,615
PENTACAM	Posición más fina( $\mu$ m)	516 (462;560)	543 (526;551)	0,412
	Volumen corneal (mm <sup>3</sup> )	58,3 (52,7; 63,1)	61,5 (61,6; 59,5)	0,278
	RMS Total	12,4 (8,7; 31,2)	12,3 (8,2; 14,1)	0,442
	RMS LOA	11,1 (8,2; 29,1)	11,8 (7,7; 13,8)	0,509
	<b>RMS HOA</b>	<b>5,5 (3,4; 11,4)</b>	<b>3,5 (2,3; 3,7)</b>	<b>0,004</b>
	Q (asfericidad)	-0,53 (-0,72; -0,43)	-0,61 (-0,66; -0,4)	0,762
	Úlceras <6 meses	<b>0 (0; 4,7)</b>	<b>0 (0; 0)</b>	<b>0,009</b>
ANAMNESIS				
EXPLORACIÓN	<b>AV ETDRS 4metros</b>	<b>50,8 (31,8)</b>	<b>81,8 (11,7)</b>	<b>0,001</b>
	Schirmer I	9 (2,2; 15)	15 (4,5; 18)	0,157
	<b>TBUT (segundos)</b>	<b>2 (3,5; 1)</b>	<b>7,5 (4,75; 10)</b>	<b>&lt;0,0005</b>
	PIO (mmHg)	12 (10; 14)	12,5 (11,75; 14)	0,192
	<b>Escala Oxford</b>	<b>4 (2; 6)</b>	<b>0 (0; 1)</b>	<b>&lt;0,0005</b>
	<b>Escala de Van Bijsterveld</b>	<b>4 (2; 5,5)</b>	<b>0 (0; 0,25)</b>	<b>&lt;0,0005</b>
	Esfera	1(-0,5; 2,31)	0,25 (-0,75; 0,5)	0,160
OSMOLARIDAD	Cilindro	-1,25 (-3,13; -0,5)	-0,625 (-1,28; -0,25)	0,162
	Eje	87,4 (48,7)	113,7 (60,5)	0,157
		294 (285; 305)	295 (286; 299)	0,838
	K5M			
	Altura menisco lagrimal	0,22 (0,17; 0,39)	0,17 (0,15; 0,21)	0,128
	NIKBUT 1º	3,2 (0; 8,9)	4,97 (1,3; 15,5)	0,274
	NIKBUT medio	9,4 (8,7)	11,2 (9,2)	0,583
	Enrojecimiento bulbar medio	1,72 (0,78)	1,48 (0,73)	0,385
	Área enrojecimiento analizada(mm <sup>2</sup> )	10,1 (6,7; 15,3)	11,4 (7,9; 13,6)	0,590
	Enrojecimiento bulbar temporal	1,57 (0,77)	1,4 (0,68)	0,489
	Enrojecimiento bulbar nasal	1,85 (0,92)	1,63 (0,82)	0,653
	Enrojecimiento limbar temporal	1,1 (0,5; 1,7)	1 (0,45; 1,15)	0,226
	Enrojecimiento limbar nasal	1,1 (0,7; 2,15)	1 (0,45; 1,3)	0,194
IVCM	Densidad c. Superficiales	416(234)	499(370)	1
	<b>Densidad c. Alares</b>	<b>3047 (1327)</b>	<b>4578 (950)</b>	<b>0,027</b>
	Densidad C. Basales centrales	4404 (2512)	6107(628)	0,321
	<b>Densidad Nervios plexo nervioso subasal corneal (<math>\mu</math>m/mm<sup>2</sup>)</b>	<b>6469 (6295)</b>	<b>21766(4970)</b>	<b>0,007</b>

Variables cualitativas en porcentajes. Mediana con los percentiles 25 y 75: Me(P25; P75).

Medias : X(Desviación estándar).

En negrita, variables con diferencias estadísticamente significativas( $p<0,05$ ) entre casos y controles

El OSDI entregado en formato papel como autocumplimentación fue de 47,5(25,8) y el OSDI entrevistado cuando se le realizaba el K5M fue de 47,3 (27,5).

El VFQ 25 tuvo un valor de mediana de 77(56.4, 86.2). Subdividiendo por áreas este cuestionario, el estado de salud general fue valorado en 73,9(17,7) y el estado de la visión en general de 58,6(21,9), siendo peor que el estado general de salud. El valor promedio más bajo en el test VFQ 25 dentro de las actividades cotidianas, fue la conducción con 52.4(40.5), marcando la importancia de la visión en la conducción.

El valor medio de la osmolaridad (Tearlab®) en los casos fue 294 (285-305) mOsm y en controles 295 (286-299) mOsm, por tanto sin apenas variación.

En la **tabla 15** se muestran los pacientes en porcentajes según cada estadio en las distintas clasificaciones.

**Tabla 15. Porcentaje de pacientes en cada estadio según las diferentes clasificaciones**

Valores en porcentaje por columnas	CONFOCAL DENG	CLÍNICA P. RAMA	CLÍNICA DENG	CLÍNICA LÓPEZ-GARCÍA		DENG MODIFICADA	SCHWARTZ	
I	43,5		44,3	32,9	A	44,4	27,5	IA
					B	4,4	32,5	IB
II	21,7	63,9	26,6	38	A	20	17,5	IC
					B	6,7	5	IIA
III	34,8	31,1	29,1	29,1	A	6,7	15	IIB
					B	17,8	2,5	IIC
IV		4,9						

## **IV.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE LA PRESENCIA DE PANNUS CON LAS DEMÁS VARIABLES, EN ESPECIAL CON LA DENSIDAD CELULAR DEL EPITELIO CORNEAL Y DENSIDAD NERVIOSA DEL PLEXO SUBASAL**

Para ello se dividió la muestra de tres formas distintas como mencionamos en el punto III.5.2 y **tabla 10**. La significación estadística hallada en la densidad celular y del plexo nervioso subasal corneal se detalla en la **tabla 16**. Se observó que sólo cuando el criterio de división fue mayor de 180° de afectación limbar y mayor de 1 mm de avance corneal, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la densidad de plexo nervioso subasal corneal. Esto mismo ocurre con la densidad de células alares. Mediante la división según todos los criterios expuestos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los todos los estadios analizados: clasificación de Paolo Rama, Schwartz, Clínica de Deng, López-García, Confocal de Deng y Deng modificado por nosotros.

Cuando se dividió la muestra por presencia o no de pannus. Las variables que tuvieron diferencias estadísticamente significativas con  $p < 0,05$  se detallan en la **tabla 17**. Llama la atención que la osmolaridad, el OSDI, la altura del menisco lagrimal, el volumen corneal y la posición más fina del pentacam no se encuentren diferencias estadísticamente significativas en los distintos grupos.

Del mismo modo se dividió la muestra según si afectaba menos de un cuadrante (3 sectores horarios) de afectación por pannus, o afectación mayor o igual a un cuadrante. En la **tabla 16 y 17** se muestran tanto las densidades celulares y del plexo nervioso subasal corneal como las demás variables con diferencias estadísticamente significativas

Tabla 16.Densidad de nervios del plexo subasal, densidad celular corneal y otras variables de interés con su significación estadística(p) entre grupos divididos según diferentes estados de avance de pannus.

	Pannus si/ no	<3h/≥3h pannus	<180/≥180
Variables	p	p	p
Densidad plexo nervioso subasal corneal	0,731	0,052	<b>0,031</b>
Densidad células superficiales zona central	0,213	0,367	0,078
Densidad células alares zona central	0,370	0,695	<b>0,006</b>
Densidad células basales zona central	0,751	0,969	0,065
Densidad células basales zona periférica	0,978	0,880	0,140

En negrita, diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ )

respectivamente. Las variables no expuestas no obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

Igualmente se separó la muestra en pacientes con conjuntivalización mayor de  $180^\circ$  y mayor de 1 mm de avance hacia el centro corneal y los que tenían menos afectación. Se analizaron todas las variables del estudio comparándolas entre dichos subgrupos, mostrando las variables y su significación estadística (**tabla 17**). En la **tabla 16** llama la atención que dividiendo la muestra por este criterio la densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal muestra diferencias estadísticamente significativas ( $P=0,031$ ), cuando la afectación del pannus es mayor a  $180^\circ$  corneales y mayor de 1 mm de avance corneal. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la osmolaridad, meibografía, presencia o no de criptas ( $p=0,057$ ), empalizadas de Vogt, densidad de células basales centrales y periféricas,

Tabla 17. Variables con diferencia estadísticamente significativa entre grupos divididos según diferentes estado de avance de pannus

Pannus si/no		<3h/≥3h pannus		<180/≥180	
Variables	p	Variables	p	Variables	p
RMS total a 10 mm y Zernike N=8	0,033			0,015	0,011
RMS LOA a 10 mm y Zernike N=8	0,028			0,004	0,029
RMS HOA a 10 mm y Zernike N=8	<0,0005		<0,0005		0,003
Enrojecimiento limbar temporal	0,008			0,003	0,001
Enrojecimiento limbar nasal	0,02			0,021	0,001
TBUT	<0,0005		<0,0005		<0,0005
Escala Oxford	<0,0005		<0,0005		<0,0005
Escala Van Bijsterveld	<0,0005		<0,0005		<0,0005
Tinción tardía y persistente	<0,0005		<0,0005		<0,0005
Brillo epitelial apagado	<0,0005		<0,0005		0,022
Córnea central afectada	<0,0005		<0,0005		<0,0005
Defecto epitelial corneal	0,001			0,048	0,002
Visualización de criptas en la microscopía confocal	0,005			0,016	0,057
NikBUT primero	0,047			0,037	
Simbléfaron	0,015				
Epífora (escala)	<0,0005				
Fotofobia (escala)	0,017				
Úlceras corneales en los ult. 6 meses	0,005				0,004
		AV ETDRS	0,001		<0,0005
		Enroj. Bulbar medio	0,005		0,003
		Enroj. Bulbar temporal	0,0057		0,013
		Schirmer I	0,043		0,054
		Edad	0,048		
		VFQ 25	0,038		
		Enroj. Bulbar temporal	0,007		

En **negrita**, las variables que independientemente del criterio de división de los grupos según el avance del pannus siempre hay diferencias estadísticamente significativas en los distintos grupos.

En **rojo** variables que aunque no fueron  $p < 0,05$ , estaban muy próximas.

superficiales, fotofobia, epífora, lateralidad ni ojo subjetivamente peor.

En el estudio multivariante, mediante la construcción de regresión logística binaria, se obtuvo que la densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal actuaba como un factor protector independiente para el pannus corneal en la IL (Odds Ratio= 0,069; IC 95%, 0,008-0,619,  $p=0,017$ ). Esta regresión logística obtuvo un índice de Hosmer y Lemeshow bueno ( $p=0,623$ ). La densidad de células basales centrales obtuvo un valor de exposición de 0,408 (0,078-2,131) por lo que no pudo considerarse asociado con el pannus. Por tanto, sólo la densidad de nervios corneales del plexo nervioso subasal corneal ha demostrado de forma independiente ser un factor de protección contra el pannus en la IL. Otras variables estudiadas en la microscopía confocal en nuestro estudio, como la densidad de células superficiales, alares, basales centrales, basales periféricas o presencia de criptas, empalizadas de Vogt, no han demostrado dicho efecto. Esto muestra claramente la importancia de valorar y medir la densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal en la IL.

### **IV.3. CONCORDANCIA DE ESCALAS DE ESTADIAJE**

Mediante el índice de concordancia Kappa se encontraron los siguientes resultados en la **tabla 18**. Según estos resultados, los mejores índices de concordancia conseguidos son entre la clasificación confocal de Deng (78) y la de signos y síntomas de Paolo Rama (209), López-García (208) y clasificación clínica de Deng (78). Aun así estamos hablando de un índice de concordancia moderado, lo que da una idea de la baja concordancia entre las clasificaciones clínicas más subjetivas y la realizada con criterios analizados con microscopía confocal.

Tabla 18. Índices Kappa de las distintas clasificaciones clínicas basadas en signos y síntomas con respecto a la clasificación confocal

<b>Clasificaciones signos y síntomas</b>	<b>Kappa</b>	<b>Grado de concordancia</b>
Clasificación de López-García	0,449	MODERADO
Clasificación de P. Rama	0,215	BAJO
Clasificación clínica de S. Deng	0,403	MODERADO

#### **IV.4. RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DE MEDIAS DE DENSIDADES CELULARES Y NERVIOS DEL PLEXO SUBASAL CON LAS REFERIDAS EN LA LITERATURA COMO VALORES NORMALES**

Al comparar las medias de nuestra muestra de pacientes con IL y compararla con la de trabajos que reportan datos de referencia en población sana queremos poner de relieve la marcada diferencia entre densidades tanto celulares como nerviosa en la córnea.

En el caso de los nervios las diferencias como se ven en la **tabla 19** son importantes y estadísticamente significativas ( $p<0,0005$ ), tanto comparadas con el trabajo de Parissi (94) como el de Lagali(98).

Con respecto a la densidad celular, si lo comparamos con el trabajo de Alexander Eckard (102) que es el de mayor tamaño muestral hasta la fecha sobre densidades celulares, hay diferencia estadísticamente significativa en todas la densidades celulares (**tabla 20**). Por otra parte, si lo comparamos con otro trabajo realizado con otro tipo de microscopio confocal (Mustonen 1998)(103), observamos que la diferencia en las densidades celulares con respecto a los datos referidos con el microscopio confocal LSCM son muy diferentes. Si además lo comparamos con nuestros datos observamos que la densidad células superficiales es un mayor que en la del trabajo de Eckardt por supuesto mucho menos tengo esta muestra de pacientes enfermos de insuficiencia limbar. En cuanto a la densidad de células basales centrales, sorprendentemente la densidad en en el trabajo de Mustonen en pacientes sanos es muy similar a la de nuestra muestra de pacientes con insuficiencia de limbo. De forma más lógica, la densidad de células basales centrales de nuestra muestra es inferior a la del trabajo de Eckardt siendo estas diferencias estadísticamente significativas( $p<0,0005$ ).



Tabla 19. Comparativa de medias de densidad de nervios del PNSB de nuestra muestra de los enfermos de IL con respecto a los valores de referencia en sanos y nuestros controles

	<b>Parissi (SANOS) 2013</b>		<b>Nuestros datos (en pacientes con IL)</b>		<b>Lagali (SANOS) 2013</b>	<b>Nuestros datos en controles sanos</b>
Nervios ( $\mu\text{m}/\text{mm}^2$ )	19000 (4500)	-12531 ( $P<0,0005$ )	<b>6469 (6295)</b>	-11831 ( $P<0,0005$ )	18300 (3700)	21766 (4970)
Ojos	207		<b>44</b>		58	5
Microscopio o Confocal	LSCM		<b>LSCM</b>		LSCM	LSCM

Tabla 20. Comparativa de medias de densidades celulares de nuestra muestra de los casos de IL con los datos de referencia en sanos y nuestros controles

<b>DENSIDADES</b>	<b>Mustonen (SANOS) 1998</b>	<b>Diferencias</b>	<b>Nuestros resultados (en enfermos de IL) 2015</b>	<b>Diferencias</b>	<b>Eckard, Stave &amp; Guthoff (SANOS) 2006</b>	<b>Nuestros resultados de controles sanos</b>
C. Superficiales (zona central, cels/mm <sup>2</sup> )	1213 (370)	-797 ( $p<0,0005$ )	<b>416 (234)</b>	-424 ( $p<0,0005$ )	840 (295)	<b>499 (370)</b>
C. Alares (zona central, cels/mm <sup>2</sup> )			<b>3047 (1327)</b>	-2023 ( $p<0,0005$ )	5070 (1150)	<b>4578 (950)</b>
C. Basales (zona central, cels/mm <sup>2</sup> )	5699 (604)	-1295 ( $p=0,630$ )	<b>4404 (2512)</b>	-4592 ( $p<0,0005$ )	8996 (1532)	<b>6107 (628)</b>
Ojos	58		<b>44</b>		92	5
Microscopio confocal	SSCM		<b>LSCM</b>		LSCM	<b>LSCM</b>

## **IV.5.RELACIÓN DE LA PRESENCIA(A) O AUSENCIA(B) DEL PLEXO NERVIOSO SUBASAL CON EL RESTO DE VARIABLES DE NUESTRA EXPLORACIÓN**

Como hemos comentado anteriormente, se dividió la población según se detectara plexo nervioso (A) en la microscopía confocal o no (B). Según esta clasificación, se analizaron las variables de nuestro estudio (**tabla 21**). El grupo A se incluyeron 32 ojos y en el grupo B 12 ojos. Llamativamente hubo más ojos izquierdos en el grupo B y más derechos en el grupo A aunque de forma no estadísticamente significativa ( $p=0,42$ ). En la **tabla 22** mostramos qué variables tuvieron diferencias estadísticamente significativa con respecto a los dos grupos. Tanto las clasificaciones confocal de Deng ( $p<0,0005$ ), clínica de Deng ( $p=0,01$ ) y la de López-García ( $p=0,003$ ), hubo diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo en la clasificación de Paolo Rama no. Entre los signos destacados en los que hubo diferencias estadísticamente significativas se encuentra la tinción tardía y persistente, córnea central afectada y el defecto epitelial corneal. Tanto en el TBUT como en la escala de Oxford y la de Van Bijsterveld, hubo diferencias estadísticamente significativas. Así mismo ocurrió con el RMS HOA del Pentacam. El resto de variables obtenidas del pentacam o del K5M no tuvieron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 21. Clasificación Deng modificada

Estadios confocal DENG 2012	Criterios				Presencia plexo nervioso subasal corneal	Ausencia plexo nervioso subasal corneal
Estadio I ó precoz	Núcleo hiperreflec tivo y visible en la mayoría de células superficial es	Tamaño celular y morfología “bastante” normal	Núcleo de células basales más prominent e y tamaño levemente aumentad o	Borde celular menos distinguible	IA	IB
Estadio II ó intermedio	Afectación de todas las capas epiteliales	Núcleo celular más prominent e	Tamaño celular aumentad o	Borde de células basales menos distinguible	IIA	IIB
Estadio III ó tardío	Metaplasia: pérdida de morfología normal de capas profundas: alares y basales	Fibrosis subasal	Neovascularización corneal (estadio 3 por sí sola)		IIIA	IIIB

En estadio I y II, debe cumplir al menos 3 de los 4 criterios de cada estadio. En estadio III, debe cumplir los tres primeros criterios, o por sí sólo tener neovascularización corneal.

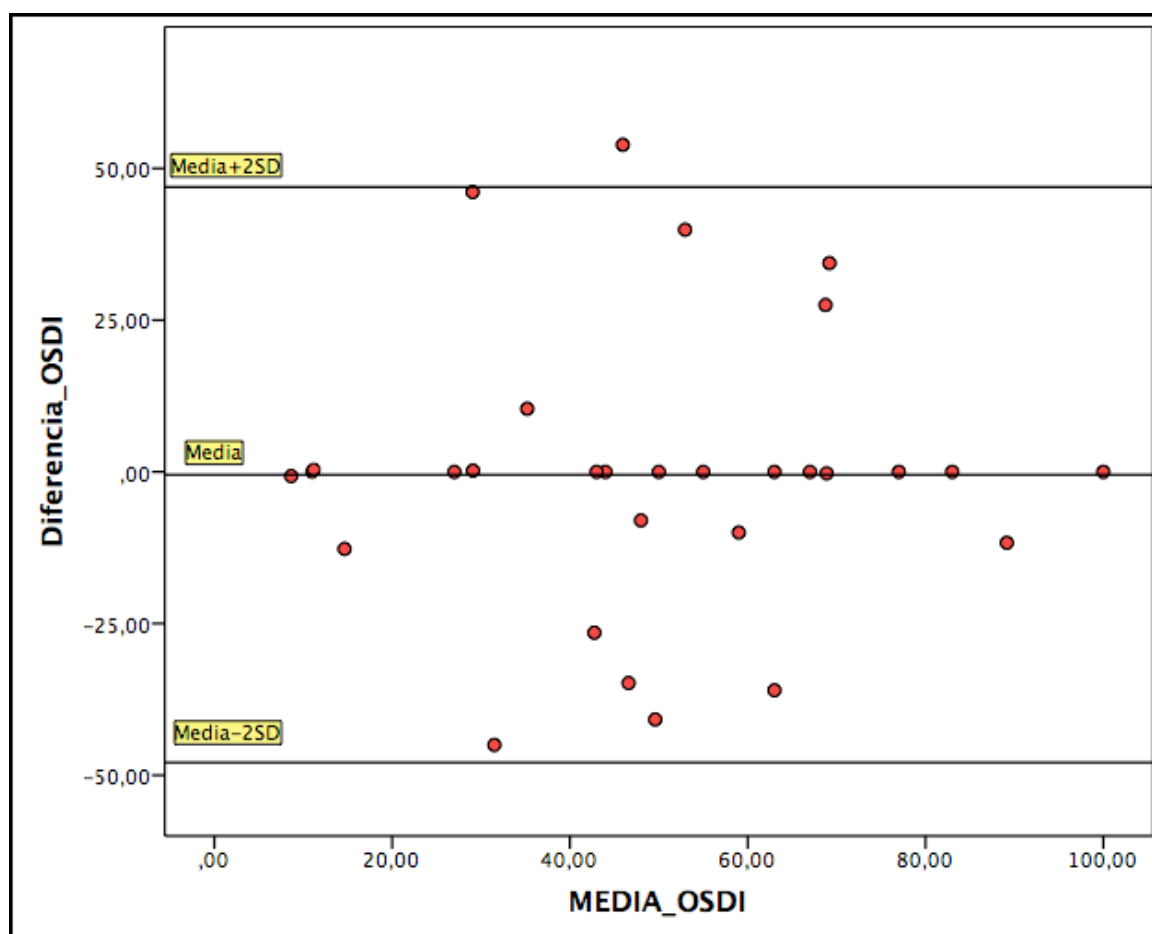
El estadio B en cada estadio se le asigna cuando no se observa en córnea central el plexo nervioso. Si se observa plexo nervioso, es estadio A.

Tabla 22. Variables con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con visualización en córnea central del plexo nervioso(A) y los que no se visualizó(B)

<b>Variables</b>	<b>Grupo A (SI plexo nervioso subasal corneal)</b>	<b>Grupo B (NO plexo nervioso subasal corneal)</b>	<b>p</b>
Córnea central afectada	9,4%	46,2%	0,012
Tinción tardía persistente	31,3%	92,3%	0,001
Defecto epitelial persistente	3,1%	30,8%	0,024
Visualización de criptas limbares en microscopía confocal	18,8%	0	0,004
TBUT	4,25(3,1)	1,92(1,7)	0,019
Escala de Oxford	2,6(2,5)	5,5(3,35)	0,003
Escala de Van Bijsterveld	2,75(2,1)	4,85(2)	0,007
Pentacam RMS HOA	5,88(4,41)	38,51(71,3)	0,021
Enrojecimiento Limbar temporal	1,025(0,61)	1,52(0,64)	0,036

## IV.6. CORRELACIÓN ENTRE OSDI DE AUTOCUMPLIMENTACIÓN Y OSDI DEL K5M INTERROGADO POR EL EXPLORADOR

Se analizó la relación entre el OSDI autocumplimentado por el paciente y el OSDI obtenido mediante entrevista al paciente realizando un análisis con el K5M. Se observó que las medias de las distintas pruebas no exhibían diferencias estadísticamente significativas. Posteriormente analizando el coeficiente de correlación intraclass se observó un valor de 0,72, que denota un buen grado de acuerdo entre las distintas exploraciones. Además en el gráfico de Bland-Atlman que se muestra en la **figura 24** se observa que las medidas están englobadas entre la media y dos desviaciones estándar, siguiendo un patrón lineal conforme a dos pruebas eso muy similares esos resultados.



**FIGURA 24. GRÁFICO DE BLAND-ATLMAN DE LA RELACIÓN ENTRE OSDI TRADICIONAL AUTOCUMPLIMENTADO Y OSDI DEL KERATOGRAPH 5M**

## **IV.7.CONCORDANCIA ENTRE TBUT Y NIKBUT**

### **PRIMERO DEL K5M**

Al comparar las medias del tiempo de ruptura lagrimal asistido con fluoresceína y el NIKBUT primero obtenido con el K5M se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,005$ ), siendo los valores de NIKBUT primero mayores que los de TBUT de forma promediada con un intervalo de 0,97 a 4,8 segundos de diferencia. Se observó un sesgo debido a que nuestras medidas de TBUT las limitamos a 10 segundos, el valor límite de normalidad, mientras que el NIKBUT del K5M llega hasta 24 segundos como valor máximo. Se corrigieron los datos para poder compararlos, seleccionando datos de NIKBUT con valores por debajo o iguales a 10 segundos. A partir de aquí, se analizó el coeficiente de correlación intraclase obteniendo un valor de 0,574(0,213-0,769) siendo este valor considerado un grado moderado de acuerdo (0,4-0,6) entre las dos pruebas, pero muy cercano a buen grado de acuerdo que se sitúa en el valor 0,6. De forma curiosa se observa en el gráfico de Bland-Altman que las medidas del NIKBUT y del TBUT se ajustan unas a otras formando una línea casi horizontal mostrando una linealidad entre dos pruebas que están midiendo lo mismo aunque de forma diferente, estando casi todos los valores entre la media y 2 desviaciones estándar (**figura 25**). Pero en la zona media del gráfico, para valores no extremos es donde hay más dispersión.

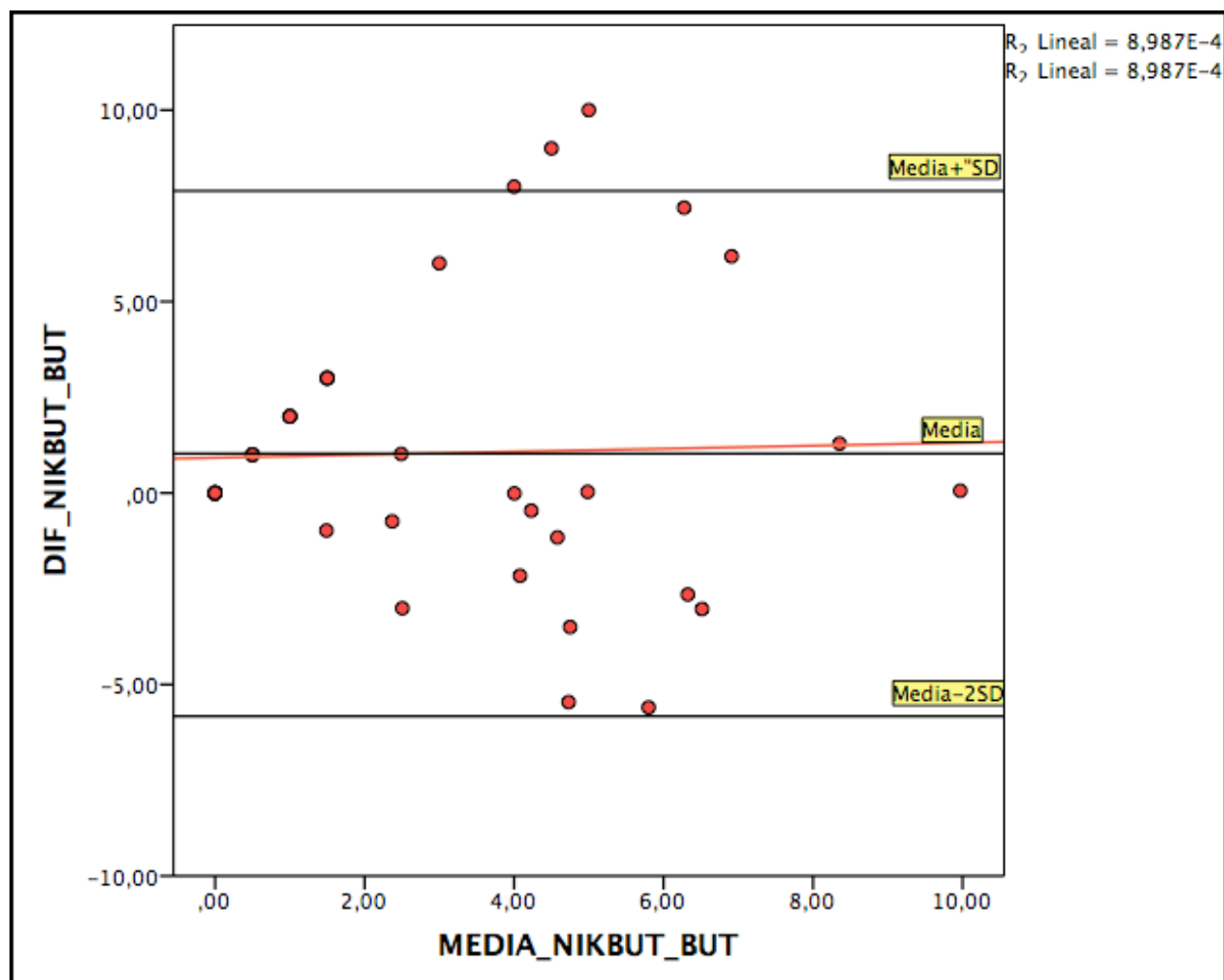


FIGURA 25. GRÁFICO DE BLAND-ATLMAN DE LA RELACIÓN ENTRE NIKBUT Y TBUT

#### **IV.8. RELACIÓN ENTRE SCHIRMER I Y ALTURA DEL MENISCO LAGRIMAL ANALIZADO CON EL K5M**

Se realizó un coeficiente de correlación de Pearson para analizar si existe relación entre ambas medidas observándose que no existía relación lineal entre ambas pruebas ( $r=0,026$ ;  $p=0,837$ ).

#### **IV.9. ANALIZAR LA RELACIÓN ENTRE ENROJECIMIENTO BULBAR MEDIO DEL K5M Y OSDI PARA AUTOCUMPLIMENTACIÓN**

Se realizó un coeficiente de correlación de Pearson para analizar si existe relación entre ambas medidas observándose que no existía relación lineal entre ambas pruebas ( $r=0,097$ ;  $p=0,453$ ).



## **IV.10.RELACIÓN ENTRE ALTURA DEL MENISCO LAGRIMAL, ENROJECIMIENTO LIMBAR TEMPORAL Y NASAL, NIKBUT PRIMERO, MEIBOGRAFÍA, OSDI DEL KERATOGRAPH 5M, OSMOLARIDAD CON RESPECTO AL ESTADIAJE CONFOCAL DE DENG**

En cuanto a la altura del menisco lagrimal, se observó que iba *in crescendo* a medida que aumentaba el grado de IL según el estadiaje confocal de Deng (78) (**figura 26**).

Respecto al enrojecimiento limbar tanto temporal y nasal, se observó que iba aumentando a medida que aumentaba el grado de IL según el estadiaje confocal de Deng (78) (**figura 27**).

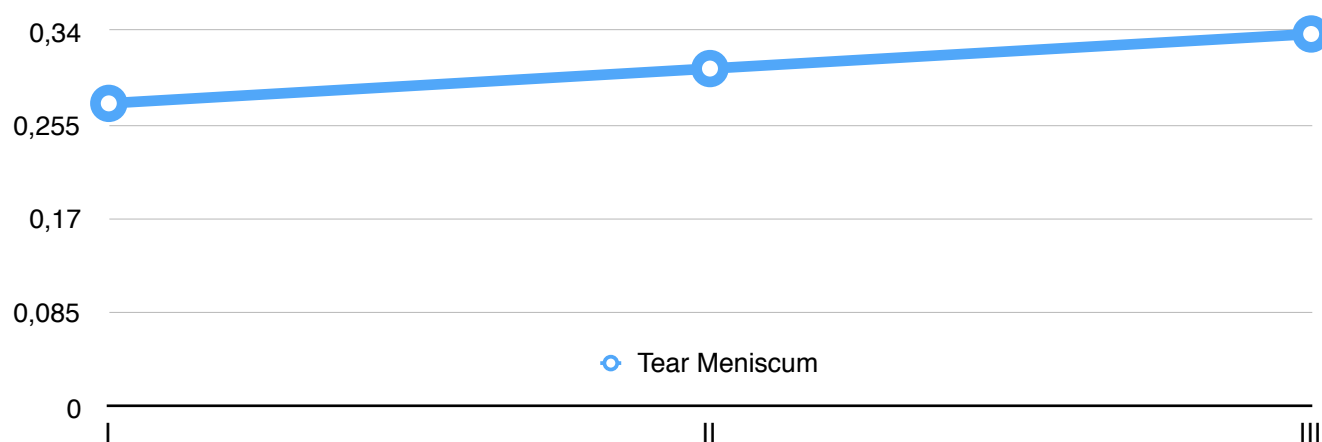
Cuando se analizó el NIKBUT se observó que iba disminuyendo con un repunte del grado II al III que es mucho menos elevado con lo que podemos decir que el NIKBUT desciende del grado I y ya no recupera ese valor en los siguientes estadios (**figura 28**).

El OSDI obtenido en el K5M desciende principalmente del grado II al III (**figura 29**). Recordemos que en el estadio III la disminución o ausencia de plexo nervioso subepitelial es característico (78) con la lógica disminución de sensibilidad. Además esto es consecuente con lo que Dua reportó en cuanto que en los estadios finales de la IL disminuyen las molestias de la superficie ocular aunque el lo relacionaba con la consecución de la conjuntivalización(21).

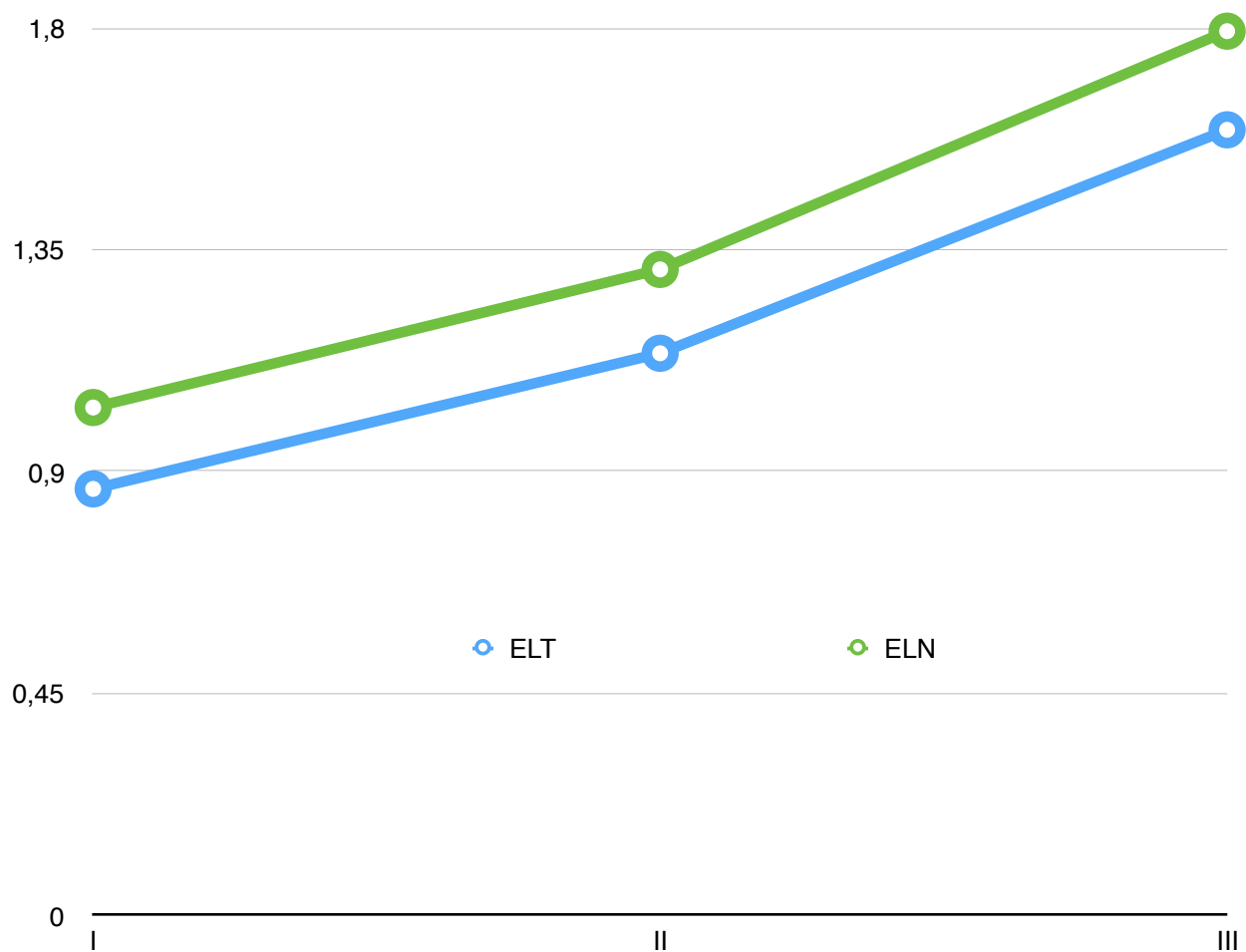
En la meibografía se observa una pérdida de glándulas de Meibomio a partir del grado II de IL según Clasificación Deng (78) (**figura 30**).

La osmolaridad se distribuyó de una manera poco homogénea aunque se tomó en el mismo sector horario, de 9 a 11 a.m, sin tratamiento tópico en las últimas 8h, a temperatura controlada (24°C) y el registro de humedad osciló entre 55-60 % de humedad relativa. Se observó que en el grado II del estadiaje hubo una clara disminución de la osmolaridad, siendo el grado III inferior al grado I (**figura 31**).

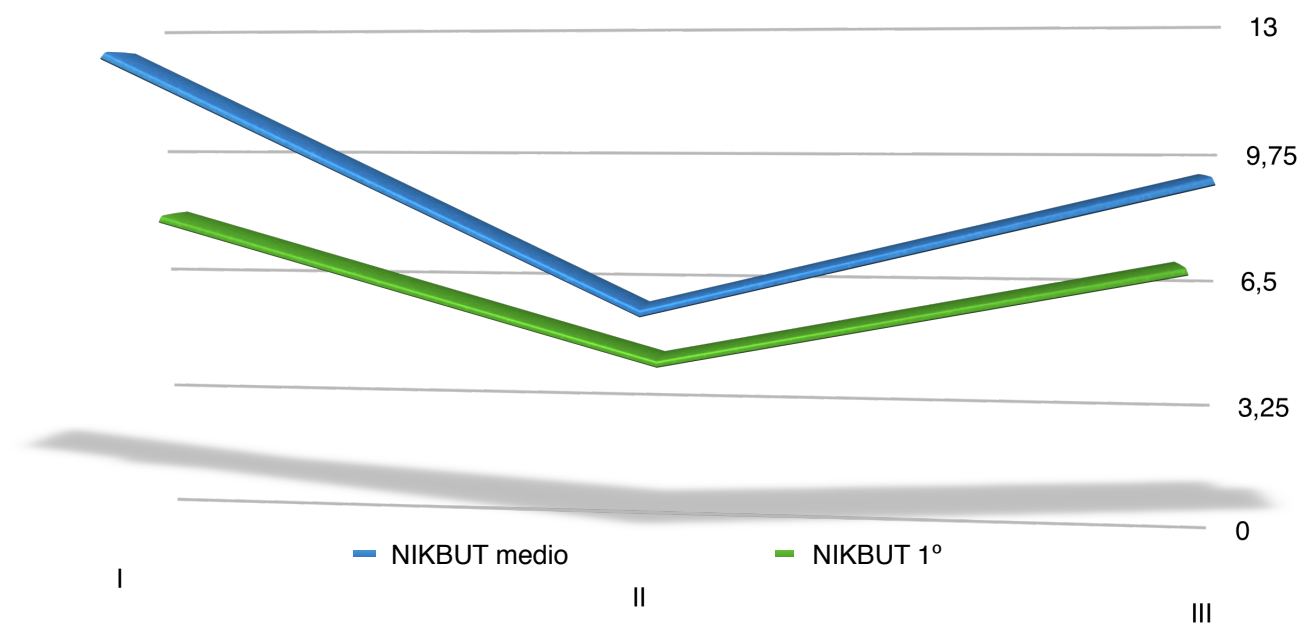
Al analizarse la relación entre los distintos estadios de la escala de Confocal de Deng y las variables del K5M mencionadas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, salvo en el enrojecimiento limbar nasal ( $p=0,047$ ).



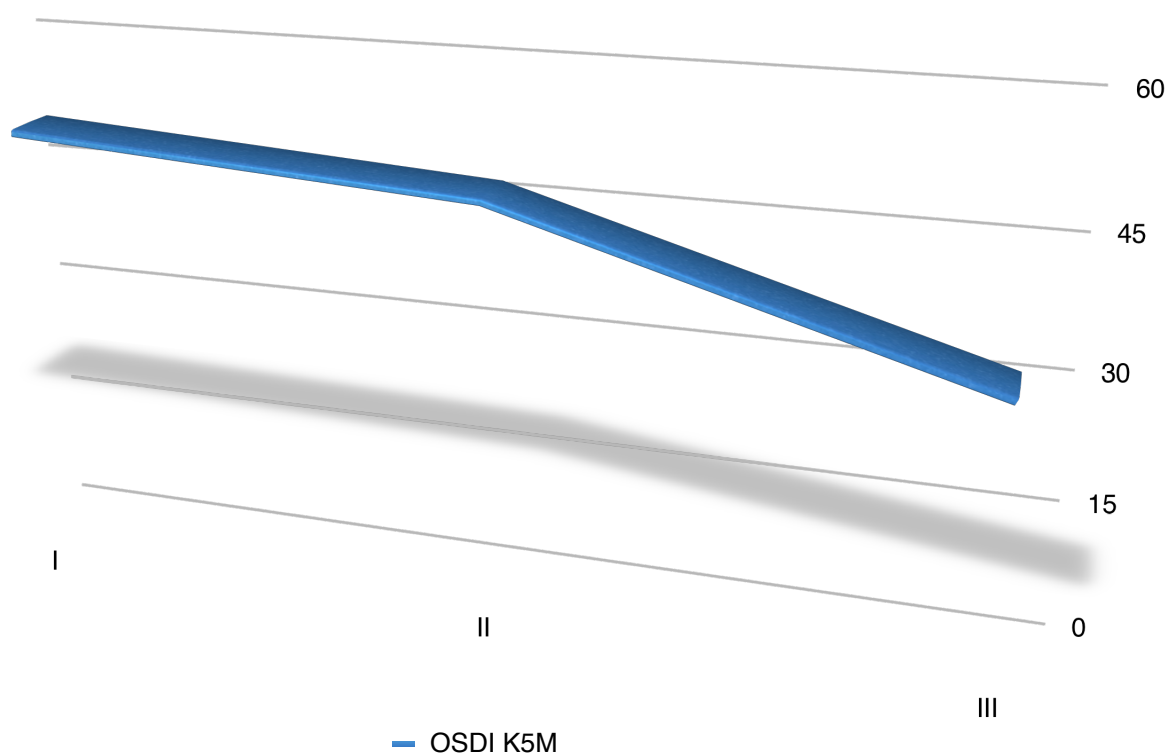
**FIGURA 26. ALTURA DEL MENISCO LAGRIMAL SEGÚN CLASIFICACIÓN CONFOCAL DE DENG**



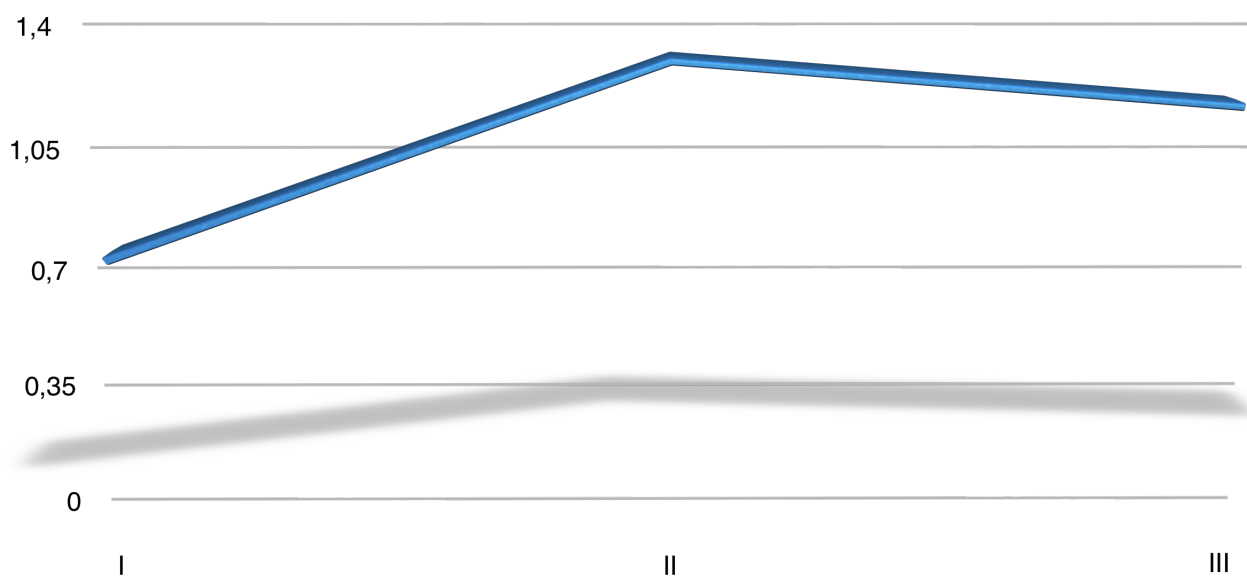
**FIGURA 27.ENROJECIMIENTO LIMBAR TEMPORAL Y LIMBAR NASAL SEGÚN CLASIFICACIÓN CONFOCAL DENG**



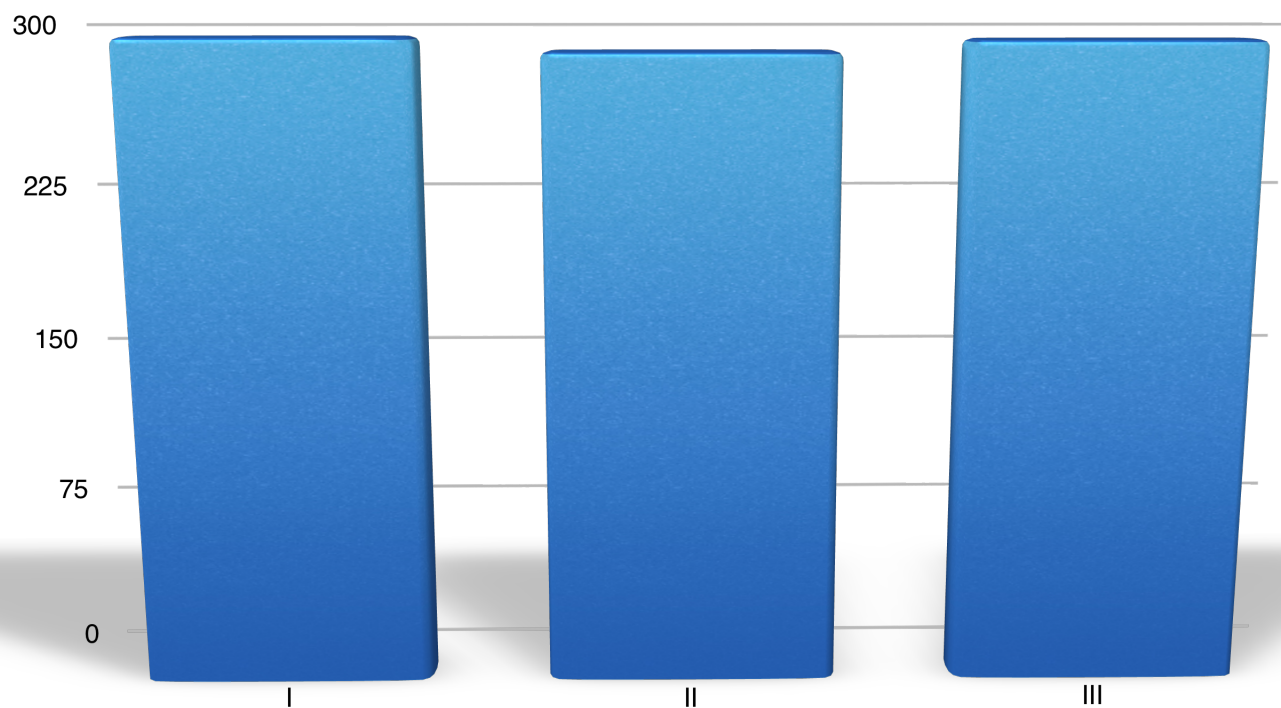
**FIGURA 28.NIKBUT PRIMERO Y MEDIO SEGÚN CLASIFICACIÓN CONFOCAL DENG**



**FIGURA 29.OSDI K5M SEGÚN CLASIFICACIÓN CONFOCAL DENG**



**FIGURA 30.GRADOS DE PÉRDIDA DE GLÁNDULAS DE MEIBOMIO SEGÚN CLASIFICACIÓN CONFOCAL DE DENG**



**FIGURA 31. OSMOLARIDAD SEGÚN CLASIFICACIÓN CONFOCAL DENG**



# **V. DISCUSIÓN**

## **V.1. DESCRIPTIVA DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA**

## **V.2. DISCUSIÓN DE LA RELACIÓN DE LA PRESENCIA DE PANNUS CON LAS DEMÁS VARIABLES, EN ESPECIAL CON LA DENSIDAD CELULAR DEL EPITELIO CORNEAL Y DENSIDAD NERVIOSA DEL PLEXO SUBASAL**

## **V.3. CONCORDANCIA DE ESCALAS DE ESTADIAJE**

## **V.4. DISCUSIÓN DE LA COMPARACIÓN DE MEDIAS DE DENSIDADES CELULARES Y NERVIOS DEL PLEXO SUBASAL CON LAS REFERIDAS EN LA LITERATURA COMO VALORES NORMALES Y CON LAS DE LOS CONTROLES**

## **V.5. RELACIÓN DE LA PRESENCIA(A) O AUSENCIA(B) DEL PLEXO NERVIOSO SUBASAL CON EL RESTO DE VARIABLES DE NUESTRA EXPLORACIÓN**

## **V.6. CORRELACIÓN ENTRE DISTINTAS VARIABLES DEL KERATOGRAPH 5M Y SU RELACIÓN CON MEDIDAS CLÍNICAS CLÁSICAS**

## **V.7.RELACIÓN ENTRE LAS PRINCIPALES VARIABLES DEL KERATOGRAPH 5M Y LA OSMOLARIDAD CON RESPECTO AL ESTADIAJE CONFOCAL DE DENG**

## **V.1. DESCRIPTIVA DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA**

Nuestra muestra se distribuyó de forma normal en cuanto a la edad, lateralidad y género, sin diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control (**tabla13**).

Con respecto a la etiología, las enfermedades mucosinequiantes suponen un gran grupo dentro de nuestro estudio, probablemente porque somos una unidad especializada en este tipo de patologías. Además contamos con una prevalencia de rosácea ocular en nuestro medio mayor que otras zonas geográficas, comparándola con el trabajo de Gris y colaboradores (207), en la cual la rosácea ocular no está presente. Comparando con dicho trabajo, en nuestro estudio no tenemos ningún paciente con aniridia(207). Por otro lado tenemos un 12,4% pacientes con EICH debido a que nuestra unidad atiende a los pacientes con EICH como complicación tras un trasplante de médula ósea, siendo la unidad de Oncohematología de nuestro complejo hospitalario, referencia en Andalucía occidental. No hay que olvidar que en la EICH, las complicaciones oculares concurren hasta en el 81,8% de los pacientes, considerándose la presencia de signos oculares un marcador de enfermedad severa y mal pronóstico. Por otro lado, hay que considerar que las células madre limbares van a soportar no sólo la respuesta inmune por parte del tejido donante alogénico (médula ósea), sino que hay que sumar la quimioterapia y radioterapia que se les aplica previamente al trasplante de médula ósea para erradicar la neoplasia subyacente(317). Por otra parte, las queratitis infecciosas están representadas en un porcentaje similar a otros estudios, alrededor de un 3%. Los causados por porte prolongado de lentes de contacto y los causados por queratitis neurotróficas son algo inferiores al estudio de Gris et al.(207) (**tabla 5 y12**).



No hemos obtenido diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles en cuanto volumen corneal (a 10 mm del ápex corneal, por defecto) y posición más fina de la córnea obtenida con Pentacam®. De forma similar, el volumen corneal y la posición más fina de la córnea no fueron diferentes en casos de diabéticos con disminución de fibras nerviosas corneales y controles. La disminución de fibras nerviosas corneales o su desaparición es un hecho común tanto en los diabéticos como en pacientes con IL (78, 132). Esto denota que la disminución de nervios corneales no influye sobre el volumen corneal ni la posición más fina corneal al menos en estas patologías.

En la encuesta VFQ-25 (Visual Function Questionnaire) se demostró un notable deterioro de la visión general con resultado de 58,6 puntos con respecto a la salud general que obtuvo una media de 73,9 puntos, siendo 100 puntos el mejor estado posible. Además el valor de la salud visual es inferior a otro descrito para otros pacientes con otras patologías de la superficie ocular, como por ejemplo en el síndrome de Sjögren con una media de 78,6 puntos (190). Este resultado confirma el grado de insatisfacción visual de estos pacientes y su problemática para desarrollar su vida en cuanto a su función visual. Esto se ve refrendado por un alto índice de caídas en nuestros pacientes y accidentes que fue motivo de abandono de varios de ellos. Dentro del VFQ-25 el apartado con menor puntuación y por tanto mayor grado de discapacidad, fue las destinadas a la conducción con 52,4 puntos. Postulamos que eso es debido por la importante repercusión que tiene la visión en su desempeño y por la necesidad legal de unos requisitos mínimos visuales. No es menos cierto y de forma llamativa, que la función social, por lo menos en nuestro entorno, no se ve mermada en absoluto con 100 puntos sobre 100.

El OSDI (Ocular surface Disease Index) muestra una tasa de molestias oculares alta, de media 47 puntos, siendo este valor muy alto si lo comparamos con la escala de OSDI

para síndrome de ojo seco (SOS) que es para la que fue diseñada, en el que valores superiores a 33 se consideran SOS severo (203).

El valor de la osmolaridad medida en nuestro estudio, no presentó cambios estadísticamente significativos entre casos y controles, si bien cabía esperar un aumento de dicha osmolaridad en el conjunto de pacientes evaluados, no encontramos una explicación razonable para este dato.

## **V.2. DISCUSIÓN DE LA RELACIÓN DE LA PRESENCIA DE PANNUS CON LAS DEMÁS VARIABLES, EN ESPECIAL CON LA DENSIDAD CELULAR DEL EPITELIO CORNEAL Y DENSIDAD NERVIOSA DEL PLEXO SUBASAL**

La invasión del tejido conjuntival junto con neovascularización sobre la superficie corneal es el signo típico del fracaso del limbo (21). Tomando éste como referencia del proceso final de esta enfermedad, se usó para dividir nuestra muestra realizando una gradación desde afectación mínima hasta 180° corneales y más de un milímetro de invasión tal y como Paolo Rama supuso el fracaso total del limbo en su clasificación (209). Mendicute y colaboradores describen que una afectación de 2/3 de la estructura limbar supone un mal pronóstico, aunque por otra parte refiere que “a pesar de todo ello, es necesario pensar que mientras exista un 25% de limbo funcional puede ser suficiente...”(212). Asimismo, Benítez del Castillo y cols., refieren como uno de los criterios de contraindicación para realizar una epiteliectomía conjuntival sectorial secuencial, la deficiencia limbar mayor de 270° (318).

Por otra parte, se usó un microscopio confocal tipo *laser-scanning* (LSCM, como el HRT-II con módulo corneal Rostock) porque es el que aporta datos más reproducibles, fiables, exhaustivos y con valores mayores que los microscopios confocales tipo *slit-scanning* (SSCM) (84).

A fin de obtener una medida del plexo nervioso subasal corneal lo más fiable y reproducible posible, se eligió la densidad de nervios corneales de dicho plexo como el *gold standard*. Esta decisión vino marcada porque la densidad de nervios corneales se ha descrito

de forma mayoritaria como la medida más reproducible y fiable del estado del daño neuropático en otras patologías como la polineuropatía diabética y la neuropatía de fibra fina (117, 133). Además es una medida de por sí, mas reproducible y sensible para el daño neuropático que la morfología, número de ramificaciones y descripción de éstas en Y o T, giros,etc (131). Por el contrario, Petroll et al. afirman que la longitud de los nervios es el indicador más plausible e indicado para la detección precoz del daño neuropático (91).

En la **tabla 16** observamos como cuando el pannus alcanza los 180° o mayor y más de un milímetro de afectación corneal, la densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal y la densidad de células alares presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo con afectación menor de 180 grados y menos de 1 mm. De otra parte, Ferrari et al. demostraron en modelos animales que una inducción de neovascularización corneal con *pellets* de factor de crecimiento de fibroblastos -potente angiogénico- en una determinada zona corneal producía una desaparición de los nervios corneales en dicha zona. Correlacionando ambos hechos podríamos suponer que una afectación de al menos 180° corneales hace que en la zona central corneal disminuyan de forma dramática los nervios corneales causando una privación sensorial, alteración de la película lagrimal y del parpadeo con una irremediable cascada hacia el fracaso limbar total que nos llevaría a la conjuntivalización de toda la córnea.

De otro lado, Deng describe puntos de corte para el diagnóstico de la IL en la densidad de células basales centrales y plexo nervioso subasal corneal. En concreto, se encontró que en pacientes con IL en estadios iniciales existía una reducción de densidad de células basales del epitelio corneal de un 38 % con respecto a los controles (punto de corte: 7930 cels/mm<sup>2</sup>) y una reducción llamativa de un 58 % en la densidad de los nervios subasales (punto de corte: 53 nervios/mm<sup>2</sup>) (78). Se conoce la relación que hay entre la células basales del

epitelio corneal y los nervios subasales corneales por la cual, mediante factores tróficos como neuropéptidos y neurotransmisores estimulan el crecimiento, proliferación, regeneración, diferenciación y posiblemente la migración celular (106). En nuestro trabajo, observamos que la densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal definía mejor el estadio de progresión de la IL, no así la densidad de células basales. Estos nervios corneales son de fibra muy fina de incluso  $0,2\ \mu\text{m}$ , amielínicos y muy sensibles a la isquemia que ocurre por ejemplo en la diabetes mellitus. Por ello, son excelentes marcadores de afectación neural (117, 133). De hecho se ha demostrado en modelos animales que la presencia de neovasos consigue en sólo 7 días, extinguir en dicha zona los nervios corneales, seguramente mediado por factores químicos relacionados con los neovasos (108). En el caso de la IL, la aparición de tejido fibrovascular sobre la superficie corneal ejerce la misma acción.

En nuestro trabajo, a fin de estudiar la importancia de la densidad de células basales y de los nervios corneales se construyó un modelo de regresión logística en el que se mostró la densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal como factor protector independiente, de forma estadísticamente significativa (Odds Ratio= 0,069; IC 95%, 0,008-0,619,  $p=0,017$ ). La densidad de células basales obtuvo un valor de exposición de 0,408 con un intervalo que incluía el 1 (0,078-2,131) por lo que no se asociaba con el pannus.

De nuestros resultados estadísticos se infiere que sólo la densidad de nervios corneales del plexo nervioso subasal corneal ha demostrado ser de por sí y de forma independiente, factor de protección contra el pannus en la IL. Sin embargo, otras variables estudiadas en la microscopía confocal en nuestro estudio como la densidad de células superficiales, alares, basales centrales, basales periféricas, presencia de criptas limbares y presencia de empalizadas de Vogt, no han demostrado dicho efecto. Conectando con esto, Niederer y

cols. refieren que mientras la densidad del plexo nervioso subasal corneal disminuye con la edad coherentemente junto con la sensibilidad corneal, y la densidad de células basales no lo hace, se puede decir que la disminución de la densidad de nervios corneales puede explicar el retraso en la curación de heridas corneales con la edad (97). Además, en modelos de experimentación se ha demostrado el retraso de la cicatrización corneal, la aparición de defectos epiteliales persistentes (319, 320) y la aparición de neovascularización corneal (108) tras realizar una denervación corneal. Todos estos hechos evidencian la importancia de la innervación corneal en el correcto mantenimiento del epitelio corneal y en el estado de avascularidad que debe mantenerse la córnea. Nuestro estudio concuerda con estos hechos, ya que la densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal se presenta como un factor protector independiente contra la neovascularización corneal en la IL.

Con respecto a la densidad de nervios, la sensibilidad corneal y los defectos epiteliales recurrentes típicos de la IL, Rosenberg y cols. demostraron la relación entre la disminución de la densidad del plexo nervioso subasal corneal y el aumento de erosiones recurrentes y el retraso en la cicatrización del epitelio corneal en pacientes diabéticos. Estos mismos autores observaron que al menos la sensibilidad corneal mecánica, no es un buen marcador de la neuropatía diabética, estando alterada sólo en estadios tardíos de polineuropatía diabética (129).

En cuanto a la aberrometría realizada por el Pentacam mediante el aberrómetro de Hartmann-Shack se observó diferencias estadísticamente significativas en la RMS total, las aberraciones de bajo orden (RMS-LOA) y las de alto orden (RMS-HOA) en todos los grupos con cualquier afectación de pannus. Pensamos que las de alto orden que son más sensibles a afectaciones periféricas podrían ser buenos marcadores de mínima afectación

limbar y se debería estudiar más concretamente su implicación en la insuficiencia limbar en futuros estudios. No hemos encontrado ninguna cita bibliográfica sobre este aspecto.

Dentro de los datos que nos aportó el keratograph 5M®, se observó que el enrojecimiento limbar tanto temporal como nasal también obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en cualquiera de las divisiones de la muestra respecto al pannus (**tabla 16**).

Por otro lado, el NIKBUT “primero” obtuvo diferencias estadísticamente significativas cuando el pannus era más leve, es decir, cuando se dividió por presencia o no de pannus o afectación de un cuadrante, no así cuando ya la división se realizó por 180° o mayor. Pensamos que sería necesaria una mayor casuística para poder establecer conclusiones mas fiables a este respecto.

Entre las variables observadas en la lámpara de hendidura, se observó como discriminantes, el defecto epitelial corneal (DEC), marcando la importancia que Dua le dio cuando lo describió como el signo con mayor significación clínica (21), la afectación de la córnea central (ACC), la tinción tardía y persistente del epitelio anómalo sobre la córnea (TTP) y el brillo epitelial apagado (BEA). Dichas variables están incluidas en las clasificaciones de López García (DEC y ACC) (208), Paolo Rama (DEC y ACC) (209) y Deng clínica (TTP, BEA y DEC) (78), y con acierto. Como vemos, en cada una de estas clasificaciones le dan prioridad a uno de estos signos(**tabla 7**). En la de López García el peso recae sobre los defectos epiteliales siendo punto de corte de un estadio a otro, siendo el criterio de defecto epitelial corneal mayor o igual a 3 episodios en los últimos 6 meses, criterio por sí solo para pasar del estadio 1 al estadio 2 de esta escala (208). En el caso de la clasificación de Rama los criterios importantes son la afectación mayor o no de 180° corneales y la afectación de la córnea central, siendo clasificado con el estadio 3 o grave si

está afectada la córnea central (209). En la escala clínica de Deng, el brillo apagado pero sobretodo la tinción tardía persistente dominan la escala, siendo el último estadio delimitado por defectos epiteliales recurrentes y conjuntivalización (78). Es muy característico el brillo apagado, incluso en pacientes con estadios leves de IL, hecho que se confirmó en nuestro estudio. Este no es más que un espejo de la pérdida de la correcta estructura y trofismo del epitelio corneal a consecuencia del daño limbar, y posiblemente como hemos comentado previamente, de la disminución de densidad de nervios corneales.



### **V.3. CONCORDANCIA DE ESCALAS DE ESTADIAJE**

El limbo esclerocorneal es una estructura que se sitúa entre la córnea transparente y la esclera blanca siendo una transición y a la vez, barrera física, entre dos epitelios con características bioquímicas y fenotípicas diferentes (4). No se debe entender como una estructura anatómica aislada, sino más bien una mecanismo complejo en el que una serie de piezas deben engranar perfectamente para que dichas células sobrevivan y se repliquen dando un epitelio sano corneal competente que ejerza su función óptica. Estas piezas son el nicho limbar, el microambiente y las propias células madre limbares. En la aniridia, por ejemplo, la pieza que falta es el propio nicho limbar ya que se ha observado que hay una ausencia de las empalizadas de Vogt (206). Esto conlleva que con el tiempo se vayan disminuyendo progresivamente las células madre limbares por falta del alojamiento adecuado que las proteja. Sin embargo, otras etiologías dañan las células limbares más que el nicho, como por ejemplo, la quimioterapia sistémica o las radiaciones. Esto también hay que tenerlo en cuenta para el tratamiento, más si es un trasplante. De hecho, en la aniridia si trasplantamos sólo células madre es difícil que sobrevivan a largo plazo porque no tienen nicho donde ubicarse. Por ello no sólo se debe clasificar según criterios clínicos, sino además hay que aportar criterios anatomopatológicos -medibles con la microscopía confocal de forma no invasiva- que nos detallen como se encuentra el nicho limbar, además de por supuesto las propias células limbares, células basales del epitelio corneal y el plexo nervioso subasal. Sin esta información, podemos errar en el correcto tratamiento a aplicar.

Al menos es necesario un 25% de limbo funcional para que pueda regenerarse el epitelio corneal (212). Sin este limbo mínimo, la conjuntivalización progresiva e implacable, a pesar de nuestros esfuerzos (hemoderivados, SSCE,...), será inevitable. Como es obvio, el epitelio conjuntival es opaco por lo que cuando el epitelio corneal es sustituido por un

epitelio conjuntival, sobretodo a nivel del eje visual, la agudeza visual se ve seriamente mermada. Por este motivo y por el dolor que ocasionan las repetidas úlceras corneales, debido a un epitelio anómalo friable, es importante diagnosticar, clasificar y tratar de un modo acorde a cada estadio de insuficiencia limbar. No sólo hay que tener esto en cuenta para el tratamiento aislado de la insuficiencia limbar, sino que también a la hora de realizar una queratoplastia penetrante con una insuficiencia limbar preexistente, existe menos de un 50% de mantener la transparencia corneal a medio plazo debido principalmente a la posterior conjuntivalización del injerto (212).

Correlacionar las distintas clasificaciones, observar cual es la más adecuada e intentar mejorarlas fue uno de los objetivos de esta tesis. Se sabe que las clasificaciones de IL actualmente clasifican la insuficiencia de limbo según síntomas y signos, principalmente observados en la lámpara de hendidura. Desde la clasificación de Schwartz y Holland, ampliamente utilizada, debida a su sencillez y su planificación a la hora del pronóstico quirúrgico hasta la de Paolo Rama en 2010, no dejan de estar basadas en observaciones subjetivas. La clasificación con microscopía confocal de Sophie Deng en 2012, no sólo aportó mayor objetividad a la clasificación, sino la posibilidad de documentar dichos hallazgos. También nos permite un diagnóstico precoz de la insuficiencia de limbo a través de signos observados en la microscopía confocal como la disminución de la densidad de células basales centrales y densidad de nervios del plexo subasal corneal. Incluso nos permite cuantificar este hecho, ya que describió un punto de corte para la células basales de 7930 células por milímetro cuadrado y para los nervios del plexo nervioso subasal corneal de 53 nervios por milímetro cuadrado. En el caso de la células basales este punto de corte mostró una sensibilidad del 95,5% y una especificidad del 100%. En el caso de la densidad de nervios del plexo subasal una sensibilidad del 87% y una especificidad de 91,7%.

Una vez clasificados todos los pacientes en las distintas escalas mencionadas en esta tesis, se correlacionaron con la clasificación confocal de Deng (78). Sólo se obtuvo un índice de correlación moderado con la clasificación de de López García y con la clasificación clínica de Deng y un índice de correlación bajo con la clasificación de P. Rama si bien esta no se pudo comparar el estadio último o severo y no presenta estadio leve, en la bibliografía consultada (209).

Por ello, es necesario realizar una clasificación basada en la clasificación confocal de Deng, pero añadiendo otros hallazgos anatomopatológicos encontrados en la microscopía confocal como la densidad de células basales centrales corneales, densidad de nervios del plexo subasal corneal, presencia de criptas y/o empalizadas de Vogt. Por nuestra parte, hemos implementado la clasificación confocal de Deng añadiéndole la presencia o no de plexo nervioso subasal en el centro corneal como factor pronóstico (**tabla 21**). La ausencia de éste se designó como grupo B considerándose como un factor pronóstico negativo. De hecho, ya se ha comentado que la densidad de nervios del plexo nervioso subasal es un factor protector independiente contra la neovascularización corneal. Se requerirán estudios con mayor tamaño muestral para verificar la utilidad en el plano terapéutico de esta clasificación.

## **V.4. DISCUSIÓN DE LA COMPARACIÓN DE MEDIAS DE DENSIDADES CELULARES Y NERVIOS DEL PLEXO SUBASAL CON LAS REFERIDAS EN LA LITERATURA COMO VALORES NORMALES Y CON LAS DE LOS CONTROLES**

El microscopio confocal *laser-scanning* se ha destacado en la literatura como el microscopio confocal con resultados más elevados y reproducibles, sobretodo en el recuento de nervios, debido a su mejor contraste y a que en las zonas periféricas de la imagen no pierde calidad como si ocurre en otros microscopios confocales (87). Por ello comparamos nuestras medidas, que fueron tomadas con un microscopio *laser-scanning*, en concreto un HRT-II con módulo de córnea Rostock, con datos de referencia realizados con este mismo tipo de microscopio.

En nuestros controles constatamos que la densidad tanto de nervios corneales del plexo nervioso subasal corneal como celular del epitelio corneal era similar a la de la literatura, por lo que no aumentamos el número de controles, ya que coincidían los valores como podemos apreciar en la **tabla 19 y 20**. Únicamente la densidad de nervios fue un poco más alta, debido según pensamos, a la corta edad de nuestros controles con una media de 37,25 (12,1; 24-57)<sup>7</sup> años ya que estas densidades son dependientes de la edad, siendo más altas en jóvenes (94, 97).

Nuestro grupo control fue tomado de los ojos contralaterales de pacientes con insuficiencia limbar monocular tras causticaciones, dicho grupo presentó un media de edad menor que el total de pacientes incluidos en nuestro estudio.

---

<sup>7</sup> Media(DE; Min-Máx)

La densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal en nuestra muestra de pacientes con IL fue muy inferior ( $6469 \pm 6295 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ ) con respecto a los trabajos en pacientes sanos de Parissi et al. ( $19000 \pm 4500 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ ;  $p < 0,0005$ ) y del equipo de Lagali ( $18300 \pm 3700 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ ;  $p < 0,0005$ ).

En cuanto a las densidades celulares, debemos comparar nuestros datos con los de Eckard, realizados con el microscopio confocal *laser-scanning*, similar al nuestro ya que los de Mustonen, obtenidos con microscopio confocal *slit-scanning*, son inferiores como es habitual según la literatura (87, 95). Como hemos comentado anteriormente, la densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal se considera el parámetro de elección por su fiabilidad y reproducibilidad para medir el daño neuropático y por ello elegimos esta medida (117, 131, 133).

Por otro lado, se ha estudiado particularmente la córnea central, ya que como ha sido descrito por otros autores, estudiar las células basales periféricas es complicado en tanto en cuanto, a veces no se pueden encontrar, siendo muy inconstante su presencia, ya que normalmente se localizan en zona anterior de las empalizadas de Vogt (difícil de explorar) e incluso muchas veces la estructura de las mismas empalizadas de Vogt, o no se encuentran o están muy desestructuradas (78). De hecho en un 20 % de los pacientes sanos no se encuentran las empalizadas de Vogt (13).

Deng y colaboradores refieren que la conjuntivalización es un fenómeno tardío demostrado en su trabajo, en el cual en estadios precoces las células del epitelio corneal no mostraban fenotipo conjuntival, sino que mantenían el corneal. No ocurría lo mismo en estadios tardíos donde las células epiteliales corneales empezaban a adoptar morfología poligonal conjuntival (78). Si adoptamos esta idea, podría ser una de las explicaciones<sup>8</sup> de la

---

<sup>8</sup> Además de las explicadas en la introducción descritas por Puangsrucharern (página 45)

baja sensibilidad de la citología de impresión, no siendo ésta, por tanto, una buena prueba de diagnóstico para estadios precoces de IL (74). Deng y cols, sólo estudiaron nervios, células basales y alares, pero no las superficiales (78). Se abstuvieron de estudiar éstas, debido a que están alteradas en el ojo seco, siendo esta patología a veces concomitante con la IL. En nuestro estudio la densidad celular de todas las capas estaba disminuida de forma significativa con respecto a los trabajos de Eckard, Stave y Guthoff, en pacientes sanos y con respecto a los valores en nuestros controles, incluidas las superficiales (**tabla 20**) (102).

Deng et al. describen en 2012 puntos de corte para diagnóstico de IL a través de la densidad de células basales centrales (7930 cels/mm<sup>2</sup>) y densidad de nervios del plexo nervioso subasal corneal (53 nervios/mm<sup>2</sup>) con unas sensibilidades y especificidades altas, indicando que una reducción de un 15,4% y un 47,7 % respectivamente, podrían asociarse a estadios precoces de IL. Asociaban una disminución de ambos parámetros como hallazgo característico en la IL, sin diferenciarlos y a pesar de posibles asociaciones con otras patologías concomitantes como el ojo seco. Incluso estudiaron y compararon la densidad de células basales centrales y la densidad de nervios del plexo subasal en estadios precoces de IL con controles sanos (12 ojos de 10 pacientes) y encontraron una disminución en estos parámetros de 38% y 58%, respectivamente (78). Partiendo de este trabajo queríamos saber que parámetro estaba más relacionado con la conjuntivalización corneal y cual podría ser un factor de confusión en la IL. Esta idea viene derivada de trabajos, como el de Niederer et al. que describieron el hecho de que con la edad disminuyen la densidad de nervios corneales, pero no la densidad de células basales (97), y por otros múltiples trabajos que refieren la importancia de los nervios corneales en el mantenimiento del epitelio corneal (78, 87, 94, 108, 117). Con el análisis multivariante observamos que la densidad de nervios corneales del plexo subasal es un factor protector, sin embargo la densidad de células basales centrales

de la córnea no se asociaba en nuestro modelo con la aparición de conjuntivalización. Deng y colaboradores confirman la importancia de la inervación corneal en el mantenimiento del epitelio corneal mediante el estímulo de la “proliferación, regeneración, diferenciación y posiblemente migración”. Este fenómeno estaría mediado por neuropéptidos, neurotransmisores, factor de crecimiento neural derivado de células gliales (GDNF) y factor de crecimiento neural (NGF) (78). Aunque ni el trabajo de Deng y cols. ni el nuestro aclaran cual de los dos parámetros, neovascularización corneal y deprivación neural, es causante uno del otro, en nuestro trabajo damos un primer acercamiento a que la disminución de la densidad de nervios corneales es un factor clave, y puede, que de mayor importancia que la disminución de la densidad de células basales centrales de la córnea. Este hecho, seguramente mediado por esos factores segregados por los nervios corneales que regulan el mantenimiento del epitelio corneal sano.

Para finalizar, podríamos decir que a pesar de las diferentes causas de IL, la disminución de la densidad de nervios corneales y la densidad de células basales centrales de la córnea es una constante en estos pacientes (78).

Todos estos hechos nos llevan a postular que la microscopía confocal mediante la medida de la densidad de nervios del plexo subasal principalmente, nos apoya en el diagnóstico precoz y ayuda a clasificar a nuestros pacientes, aunque deberán realizarse estudios con mayor tamaño muestral para poder dilucidar el límite entre estadios intermedios y avanzados.

## **V.5. RELACIÓN DE LA PRESENCIA(A) O AUSENCIA(B) DEL PLEXO NERVIOSO SUBASAL CON EL RESTO DE VARIABLES DE NUESTRA EXPLORACIÓN**

Partiendo del punto anterior y debido a la necesidad de aportar algo más de objetividad y sobretodo, al pronóstico para actuar de forma adecuada en el tratamiento y seguimiento de estos pacientes, se modificó la clasificación confocal de Deng. Primeramente, se dispusieron los criterios de forma ordenada como se observa en la **tabla 21** según los distintos estadios y clasificamos a los pacientes según estos criterios. Además se dispusieron una serie de reglas para clasificar a un paciente en un determinado estadio. Creemos que al ordenar más estos criterios podemos clasificarlos de forma más clara, estructurada y sencilla.

Para entender la complicación de dicha clasificación y nuestro intento por ordenar un poco más los hallazgos encontrados en la microscopía confocal en pacientes con IL descritos por Deng y colaboradores, exponemos de forma literal la parte del artículo donde la detalla:

*“The wing layer was affected in half of the patients. The nuclei became hyperreflective and visible at the more superficial layer in early LSCD (Figure 2A, second row). The cell size and shape were fairly normal. The basal cells became slightly bigger, and some exhibited prominent nuclei. The cell border was less distinct than that seen in healthy subjects. In the intermediate group, these morphologic changes became more advanced (Figure 2A, third row). The epithelial cells at all levels were affected. The nuclei were very prominent and the cell size increased. The cell border became less distinct at the basal layer.*



*Epithelial cells in the late stage showed significant metaplasia. The normal morphology of basal and wing epithelial cells was lost. Only a couple layers of metaplastic cells were detected. Subbasal fibrosis and neovascularization were observed in this stage. The SND decreased in patients with LSCD. No subbasal nerves were detected in patients with late-stage LSCD. The morphologic changes in the limbal epithelium were similar to those observed in the cornea (Figure 2B). The palisades of Vogt were absent at the affected sector of the limbus, and there was an increase in reflectivity at the immediate subbasal layer. The vascular fibrotic tissues completely replaced the normal limbal epithelium at the late stage of LSCD.”*

Además, añadimos la presencia o ausencia del plexo nervioso como un criterio pronóstico por sí sólo, dando un paso más hacia una clasificación que proporcione el andamiaje correcto para poder seleccionar mejor el seguimiento y el tratamiento en la IL. En cuanto a este punto en concreto, se les asignó a los pacientes con plexo nervioso la letra A al estadio que pertenecían de la clasificación confocal de Deng, p.ej, IA. Si no observábamos plexo nervioso se denominó estadio B, siguiendo el ejemplo anterior, IB (**tabla 21**). De esta manera, se denominó a los estadios sin plexo nervioso: IB, IIB y IIIB.

Deng acerca del plexo nervioso subasal comenta que en el último estadio de su clasificación, no se observa normalmente. Nosotros añadimos la posibilidad de no observar el plexo nervioso en cualquiera de los otros estadios, aunque es poco probable encontrarlo en el estadio III, nosotros observamos, en algún paciente estadio III, el plexo nervioso aunque muy desestructurado, de densidad disminuida y morfología aberrante.

Una vez realizada esta clasificación, se compararon las variables estudiadas entre los pacientes en los que si se observó plexo nervioso corneal (grupo A) y en los que no se

observó (grupo B) (**tabla 22**). Se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos en signos y síntomas clínicos críticos en las distintas clasificaciones, como los defectos epiteliales persistentes ( $p=0,024$ ; clasificaciones de Deng clínica, Rama y López García), tinción tardía persistente ( $p=0,001$ ; clasificación clínica de Deng y López García), córnea central afectada ( $p=0,012$ ; clasificación de Rama y López García). Estos signos y síntomas son cruciales en las distintas clasificaciones y creemos que son reflejo de la presencia o no del plexo nervioso al estar vinculado a la adecuada homeostasis corneal. Su ausencia conlleva al desequilibrio de esta homeostasis y se manifiesta en estos signos y síntomas. De hecho, el retraso en la cicatrización corneal está relacionada con la edad y ésta se ha mostrado clave en la disminución de la densidad de nervios corneales (97). Por otro lado, se ha demostrado la acción favorecedora en los defectos epiteliales recurrentes y el retraso en la cicatrización corneal de la polineuropatía diabética a través de la disminución de densidad nerviosa en la córnea (132). Esto confirma que los defectos epiteliales recurrentes en nuestro grupo B sin plexo nervioso fuera más frecuente.

De otra parte, el tiempo de ruptura lagrimal era menor en el grupo B sin plexo nervioso ( $p=0,019$ ), siendo los valores de las escalas de Oxford ( $p=0,003$ ) y de Van Bijsterveld ( $p=0,007$ ) más altos en este grupo (**tabla 22**). Esto hace suponer que la ausencia de plexo nervioso conlleva inestabilidad lagrimal y epiteliopatía de mayor severidad. De forma coherente el enrojecimiento limbar temporal es mayor en el grupo B que A ( $p=0,036$ ) manifestando el alto grado de inflamación y vascularización en dicho grupo (**tabla 22**).

Cuando analizamos las aberraciones de alto orden con Pentacam®, el grupo B mostraba valores significativamente mayores desde el punto de vista estadístico frente al grupo A ( $p=0,021$ ) (**tabla 22**). Sabemos que las aberraciones de alto orden se afectan en mayor grado en zona periférica que es justamente donde comienza el pannus; asimismo,

Ferrari et al. demostraron en modelos animales como la denervación conlleva a la neovascularización corneal (108).

Además las irregularidades en la superficie corneal en la IL, debidas a la inestabilidad lagrimal, defectos epiteliales y conjuntivalización, aumentan las aberraciones de alto orden. De hecho, se ha observado que las irregularidades aumentan en pacientes intervenidos de cirugía refractiva corneal y en pacientes con tiempos de ruptura lagrimal cortos. En pacientes con dichas irregularidades, las aberraciones de alto orden están aumentadas y disminuyen al instilar lágrimas artificiales, uniformizando la superficie corneal(163, 180). Por ello en pacientes con IL sin plexo nervioso corneal, la inestabilidad de ese epitelio, por la disminución del tiempo de ruptura lagrimal entre otras causas, conlleva aumento de las aberraciones de alto orden.

## **V.6. CORRELACIÓN ENTRE DISTINTAS VARIABLES**

### **DEL KERATOGRAPH 5M Y SU RELACIÓN CON**

### **MEDIDAS CLÍNICAS CLÁSICAS**

Una primera cuestión que quisimos observar era si existía correlación entre el *Ocular Surface Disease Index* (OSDI) autocumplimentado clásico traducido al español y validado (189, 321, 322), con respecto al del keratograph 5M® interrogado o entrevistado.

En pro de validar su similitud, los comparamos, obteniendo un coeficiente de correlación intraclassa bueno (0,72) que confirmaba que ambos cuestionarios miden de forma similar los síntomas de la superficie ocular al menos en pacientes con IL. Además en el gráfico de Bland-Altman (**figura 23**) podemos ver que es una relación lineal por lo que podemos afirmar que al menos en estos pacientes es similar y equivalente el uso de ambas formas de aplicar este cuestionario.

El cuestionario OSDI validado por Rhett Schiffman et al. en 2000 (189), fue diseñado para diagnosticar cualquier tipo de ojo seco y graduar su severidad. Tuvo buenas correlaciones con otras pruebas para ojo seco como Schirmer, tiempo de ruptura lagrimal (TBUT) y los cuestionarios NEI-VFQ 25, McMonnies y el *Short Form-12 Health Status*. Aunque se diseñó originariamente para el síndrome de ojo seco usándose ampliamente para ello (190-192), también se ha utilizado para valorar el efecto sobre la superficie ocular del tratamiento antiglaucomatoso (193, 194), lentes de contacto (195, 196), enfermedad distiroidea con afectación ocular (197, 198), disfunción de glándulas de meibomio (199, 200), incluso para valorar el efecto en la SO de la polución ambiental (201) y el SAOS (202) entre muchas otras patologías.

En el grupo de trabajo DEW (Dry Eye WorkShop) se describe el cuestionario OSDI según se describe en la **figura 31** (323). En este mismo texto, hay que destacar que el OSDI aparece claramente como un test de *autocumplimentación* donde se le invita al paciente a rellenar esas doce preguntas.

Por otra parte, aunque el texto del OSDI que realizamos en el keratograph 5M es similar al del OSDI autocumplimentado, en el del Keratograph 5M el explorador pregunta, puede aclarar las dudas del paciente sobre dichas preguntas, siendo dinámico e interactivo, por lo que el método de recogida de información es sensiblemente diferente.

Clayton y colaboradores observaron la concordancia de varios cuestionarios usados para medir la visión, comparando los cuestionarios clásicos en papel y los rellenados mediante páginas web, en pacientes con patología de la superficie ocular (n=68) y en pacientes sanos (n=50). No obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos, al igual que nosotros cuando hemos comparado diferentes métodos de realizar el cuestionario OSDI. Sólo obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre la puntuación obtenida en pacientes mayores de 40 años que fue superior a los de menos de 40 años, pero en ambos tipos de cuestionarios y debido al peor estado de la superficie ocular (324).

Con estos datos podemos afirmar que ambos cuestionarios aunque cambien su forma de recabar la información, son similares y pueden usarse de forma ambivalente.

Con respecto al tiempo de ruptura lagrimal, correlacionamos el tiempo de ruptura lagrimal clásico (TBUT, *tear break-up time*) y el tiempo de ruptura lagrimal no invasivo (NIBUT, *no invasive break up time*) obtenido por el keratograph 5M®, denominado NIKBUT.

Aunque el TBUT sigue siendo el test más usado para determinar la estabilidad lagrimal (167, 168), mide lo mismo que el NIKBUT pero de formas diferentes. Ambos miden la estabilidad del film lagrimal. El NIKBUT mide la ruptura de la lágrima observando la distorsión de una imagen proyectada en la córnea cuantificando cuanto tiempo tarda en romperse tras un parpadeo. El keratograph 5M® nos aporta el NIKBUT primero, medio y el nivel de ojo seco según el NIKBUT. De éste usamos principalmente el NIKBUT primero porque es el que se asemeja más al TBUT original.

El NIKBUT medido por el Keratograph 5M® obtiene valores hasta 24 segundos y sin embargo el TBUT lo cuantificamos hasta 10 segundos (su límite de normalidad), esto hacía que la media aritmética se afectara con valores extremos del NIKBUT. Por ello, daba resultados paradójicos e incoherentes con la literatura consultada, donde el NIKBUT debido a su mayor sensibilidad obtiene valores más cortos que el TBUT. A raíz de esto, en el análisis estadístico se limitaron los valores del NIKBUT a 10 segundos para poder compararlos con el TBUT obtenido.

De esta guisa, al comparar el NIKBUT primero limitado a 10 segundos y el TBUT (de por sí limitado por nosotros a 10 segundos) se obtuvo diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,007$ ) siendo el NIKBUT (2,46; 3,1 segundos)<sup>9</sup> menor que el TBUT (3,3; 3 segundos) (**tabla 13**). No obstante, los resultados de NIKBUT y TBUT se correlacionaron bien, con un grado moderado de correlación (coeficiente de correlación intraclase de 0,57), muy cerca de obtener un grado bueno de acuerdo ( $>0,6$ ) (**tabla 11**) como se observa en el gráfico de Bland-Altman para estas variables (**figura 24**).

Por otro lado, es conocida la baja reproducibilidad del TBUT, ya que esta prueba se ve influida por la experiencia del explorador, parpadeos parciales, tipo de iluminación de la

---

<sup>9</sup> (Media;Desviación estándar)

lámpara de hendidura e incluso por las características del colirio de fluoresceína, volumen instilado, pH, concentración, conservantes, fluoresceína en tiras o en colirio, etc (176-178).

De ahí, los intentos por medir la estabilidad lagrimal de forma objetiva, reproducible y no invasiva (179). De hecho, Cebreiro y colaboradores informaron de que las medidas automáticas del NIBUT -como por ejemplo el NIKBUT- eran similares a las obtenidas clínicamente (TBUT) por un observador experto (325). En nuestro estudio, se realizaron tanto las medidas del TBUT como del NIKBUT por un único explorador.

Sin embargo, otros autores como Cho, Nichols y colaboradores informaron de pobres correlaciones entre TBUT y NIBUT -no automatizada como el NIKBUT-, siendo el NIBUT más largo normalmente que el TBUT ( 326, 327). Otros autores, tras mejoras en la medida del NIBUT obtuvieron en sujetos sanos valores similares al TBUT (173, 177). Por otro lado, Madden y cols. remarca la falta de reproducibilidad interobservador en el NIBUT cuando este era medido de forma subjetiva, como ocurría con el Tearscope® (328).

Pult y cols. en 2011 compararon la estabilidad lagrimal, medida con el Tearscope® (NIBUT no automatizado) de Keeler con el Keratograph® (NIKBUT) de Oculus obteniendo que aunque se correlacionaban bien ( $r=0,54$ ), el NIKBUT era más corto que el NIBUT obtenido por el Tearscope®. Por otro lado, observaron mejor reproducibilidad y predictibilidad en ojo seco -diagnostico basado en clínica y OSDI- con el Tearscope® que con el Keratograph® (329). Best y colaboradores obtuvieron, asimismo, valores más cortos con el Keratograph® que con el Tearscope®, observando mejor correlación de los valores con el Tearscope® con los síntomas del paciente. Este autor refiere que se debe ajustar el keratograph® a los valores del Tearscope® y por tanto, mejor a la clínica. Aunque nuestros resultados confirman tiempos más cortos del NIKBUT con respecto al TBUT, hay decir que el verdadero problema del NIBUT obtenido con el Tearscope® y el TBUT, es que son

métodos subjetivos, con la falta de reproducibilidad que esto conlleva como confirmaba Madden(328) y por tanto incapacidad para inferir resultados y compararse con otros estudios o patologías. El Tearscope® consiste en un emisor de luz que se acopla a la lámpara de hendidura y proyecta los discos de plácido hacia el film lagrimal y es el observador, de forma subjetiva, quien describe si hay o no ruptura del film lagrimal (179). Por el contrario, el NIKBUT es obtenido de forma objetiva por el Keratograph®, sin poder modificar dichos datos y obteniendo una precisión mayor que con métodos subjetivos. Se obtiene, como en este trabajo siguiendo las especificaciones de Mengher, que describe el NIKBUT como el tiempo comprendido desde el último parpadeo completo hasta la primera distorsión de las miras proyectadas en el film lagrimal (330). Hong et al. describen que los valores del NIKBUT son más bajos que los del TBUT (medido con fluoresceína sin conservante y al 1%), explicando que detecta más precozmente disrupciones en la película lagrimal por el keratograph 5M® aun estando bien correlacionadas ambas medidas (Spearman  $p=0,55$ ). Nuestros resultados se asemejan a los de Hong y colaboradores, siendo más cortos los valores obtenidos con el NIKBUT que con el TBUT. Asimismo, Hong et al., describen una reproducibilidad buena intra e interobservador del NIKBUT con coeficiente de variación (CV) de 12,8% y coeficiente de correlación intraclase (ICC) de 0,93, y CV de 15,4% y ICC de 0,88, respectivamente (184). En nuestro estudio, el coeficiente de correlación intraclase fue inferior aunque moderado-bueno (ICC=0,57), aunque hay que aclarar que Hong midió este parámetro en una muestra más uniforme con síndrome de ojo seco y nosotros en pacientes con IL de múltiples etiologías y en diferentes estadios. Por último, Hong y cols., obtuvieron una sensibilidad para ojo seco del 84,1% y una especificidad del 75,6%(184).

Sweeney y cols. preconizan métodos para medir la estabilidad lagrimal que sean objetivos, que midan sólo en el intervalo de un parpadeo normal, sin usar ninguna sustancia



que pueda alterar el mismo. Por otro lado, estos autores refieren que el estudio de la porción lipídica de la lágrima, por ejemplo mediante interferometría nos aportaría más información (179).

De hecho, el keratograph 5M® como vimos, también mide la capa lipídica de la lágrima según una escala de colores asistida por interferometría pero aun no lo cuantifica numéricamente. No hay que olvidar que la porción lipídica de la lágrima es crucial para evitar la evaporación de la porción acuosa y para mantener la estabilidad de la misma(331).

Por otro lado, estos métodos objetivos de medición de la estabilidad lagrimal deben ser además repetibles intra e interobservador y fiables para poder comparar los resultados de los pacientes en diferentes patologías y en respuesta a diferentes tratamientos.

Por otra parte, evaluamos la relación entre el Schirmer I y la altura del menisco lagrimal obtenida mediante el keratograph 5M®. Estas dos magnitudes han sido analizadas en ojo seco pero no en pacientes con IL (332). Además hay que decir que la altura del menisco lagrimal aunque es una prueba documentable no es objetiva ya que el explorador debe situar el “caliper” entre dos puntos a fin de medir dicha distancia.

El test de Schirmer ha sido una prueba clásica en el estudio de patologías de la superficie ocular y analiza la cantidad de lagrima segregada basal y refleja en el tipo I y basal en el tipo II (con anestesia tópica). En nuestro trabajo usamos el tipo I mediante técnica de Farris modifica por Vitali, esperando 5 minutos, sin anestesia y ojos cerrados (306, 333).

Esta medida tiene el problema de la gran variabilidad intrasujeto e interconsulta, que disminuye en ojos secos acuadeficientes. Se usó tradicionalmente el punto de corte para ojo

seco descrito por Van Bijsterveld, siendo éste de  $\leq 5,5$  mm (304, 334), pero luego Pflugfelder y otros lo modificaron a  $\leq 5$  mm que es el valor más aceptado actualmente (174, 335).

Nuestros datos reflejan que no hay correlación entre la altura del menisco lagrimal medida con el keratograph 5M® y el Schirmer I en pacientes con IL, con un coeficiente de Pearson de 0,026 ( $p=0,837$ ).

Baek et al. encontraron correlación positiva entre Schirmer con anestesia y la altura del menisco lagrimal (TMH) con Pearson 0,435 y entre Schirmer con el TBUT de 0,334 en paciente con ojo seco ( $p<0,001$  para ambos) (332).

La variabilidad en la medida del Schirmer viene derivada de la técnica, de por sí, invasiva, de la propia variabilidad intrasujeto y de las condiciones ambientales. Esta variabilidad hace de esta técnica una medida poco fiable por su baja repetibilidad (332). Aunque la altura del menisco lagrimal también es subjetiva, ésta ha demostrado buena repetibilidad en el estudio de Baek y cols (332). Asimismo, hay que decir que esta medida, la TMH, es similar a la que se realiza con el *Fourier domain optical coherence tomography* (FD-OCT) teniendo también ésta, buena repetibilidad en varios estudios (336-338).

Todos estos estudios son en pacientes con síndrome de ojo seco o disfunciones de glándulas de meibomio, pero ninguno en IL, donde además de un problema lagrimal hay un gran componente inflamatorio y de desestructuración del segmento anterior. Por ello, los resultados no son comparables, pero no hemos encontrado datos sobre la altura del menisco lagrimal en IL ni con keratograph® ni con un FD-OCT.

Asimismo, se analizó la relación entre el enrojecimiento bulbar medio (EBM) obtenido de forma objetiva con el keratograph 5M® y el OSDI tradicional autocumplimentado. Con ello, buscamos ver si existía relación entre la hiperemia bulbar,

posible signo de inflamación de la superficie ocular y el OSDI que aunque originariamente se aplicó para síndrome de ojo seco, se usa ampliamente en la patología de la superficie ocular como describimos anteriormente.

No hemos encontrado hasta la fecha estudios que relacionarán dichas variables en la IL.

La hiperemia analizada con el K5M ha mostrado repetibilidad intra (índice de correlación intraclass= 0.947) e interobservador (ICC=0,889) altas, siendo mejor prueba, más fiable y repetible que las escalas de hiperemia *Institute for Eye Research* (IER) (conocida posteriormente como CCLRU), la escala *Efron* y la *Validated Bulbar Redness* (VBR) de 10 imágenes (187).

En nuestro estudio observamos que no existía relación entre estas dos variables, al menos de forma lineal, con un coeficiente de Pearson  $r=0,097$  ( $p=0,453$ ). Hay que decir que el Keratograph 5M® no es capaz de diferenciar entre hiperemia bulbar, episcleral o escleral, siendo esta una de sus limitaciones. Por otro lado la hiperemia no siempre debe significar molestias o sintomatología ocular, por ejemplo, como ocurre en la hiperemia bulbar como efecto secundario del tratamiento para el glaucoma con prostaglandinas que no siempre está asociada a molestias oculares (339-341).

## **V.7. RELACIÓN ENTRE LAS PRINCIPALES VARIABLES DEL KERATOGRAPH 5M Y LA OSMOLARIDAD CON RESPECTO AL ESTADIAJE CONFOCAL DE DENG**

Se compararon los parámetros principales obtenidos con el K5M y su relación con cada estadio de la clasificación confocal de Deng (78).

La altura del menisco lagrimal iba *in crescendo* a medida que se aumentaban los estadios de esta clasificación, explicado seguramente porque el componente inflamatorio iba también en aumento, incrementando a su vez la secreción lagrimal.

Las variables “enrojecimiento” (hiperemia), limbar temporal y limbar nasal aumentaban en relación a los estadios, informando del grado de inflamación, e incluso de aumento de vascularización en dicha zona. Estas variables fueron las únicas que cambiaban en cada estadio de forma estadísticamente significativa.

Por ello creemos que el parámetro “enrojecimiento limbar” tanto nasal como temporal y la altura del menisco lagrimal pueden ser buenos parámetros para medir la severidad limbar, en cuanto miden ambos el estado inflamatorio de la superficie ocular, aunque se requerirán estudios con mayores tamaños muestrales para estudiar este efecto en dichas medidas.

El NIKBUT tanto primero como medio se comportaban de manera similar bajando del estadio I al II de forma muy intensa y luego repuntaba un poco sin ser estadísticamente significativo, posiblemente por el aumento de la secreción lagrimal comentado, manifestado en el aumento de la altura del menisco lagrimal. Suponemos que el descenso del estadio I al II responde al cambio inflamatorio y desestructuración de elementos básicos para mantener

el film lagrimal, como son las glándulas lagrimales, células caliciformes y glándulas de meibomio.

Continuando con las glándulas de Meibomio, ocurre lo mismo que con el NIKBUT de forma coherente. La pérdida de glándulas de Meibomio fue progresivamente creciente confirmando que en la IL existe además una desestructuración de los elementos constituyentes de la superficie ocular por el ambiente proinflamatorio reinante en esos estadios.

Respecto a la medida de la osmolaridad, se observa que no hay cambios según los diferentes estadios, por lo que pensamos que la osmolaridad puede no ser un buen parámetro para medir la severidad de la IL, aunque se deben realizar estudios con mayores tamaños muestrales para confirmar este punto.

Determinados estudios refieren en cultivos de células limbares humanas, la secreción de citoquinas proinflamatorias cuando se someten a un ambiente hiperosmolar (400-500 mOsm) (342). Además es sabido, que la hiperosmolaridad lagrimal en la queratoconjuntivitis sicca causa una cascada proinflamatoria en las células epiteliales corneales (310, 343). Por el contrario, no hemos encontrado artículos que aportarán datos sobre el comportamiento de la osmolaridad en la IL.

Este grado de inflamación de la superficie ocular que se observa de forma coherente en todas las variables, discrepa cuando miramos el gráfico del OSDI. En este gráfico descubrimos una disminución del grado II al III de forma clara y brusca. Esta disminución se explica en la medida en que el grado III de forma habitual no existe plexo nervioso corneal y por tanto la sensibilidad corneal está disminuida (78), lo que justifica el descenso del valor del OSDI que mide sintomatología de la superficie ocular del grado II al III. De

hecho, Dua y cols. refieren que en la IL total hay que dejar que la córnea se conjuntivalice - se enfríe-, antes de acometer el procedimiento quirúrgico de elección, disminuyendo así las molestias. Esto confirma justamente el hecho de que en estadios finales la conjuntivalización y su par, la denervación corneal, disminuyen la sensibilidad corneal y por tanto, la sintomatología ocular (21). Por otro lado y en nuestra experiencia hemos observado que en pacientes en los que se le ha hecho un autotrasplante limbar, presentan mucho más dolor, molestias y epífora por la sustitución de un epitelio conjuntival ya establecido por otro corneal en constante renovación y friable, con frecuentes desepitelizaciones hasta que se consigue completar la superficie corneal. Esto sucede porque a pesar de la desepitelización que se realiza en el mismo acto quirúrgico de ese tejido fibrovascular anómalo y la colocación de los explantes limbares, a veces no se consigue que de primeras crezca el epitelio corneal sano en toda la córnea, siendo necesario recurrir a desepitelizaciones seriadas (SSCE) hasta conseguirlo. Por otro lado, según lo comentado en el punto V.2 de la discusión, en relación con la neovascularización corneal y la ausencia de nervios como refería Ferrari et al. (108), postulamos que ocurre a la inversa en este caso. Esto es, que al realizar trasplante de limbo, la inervación corneal vuelve en la medida que desaparece la conjuntivalización y aparece un epitelio sano que mediante la mediación química reseñada consigue favorecer dicha inervación. En este punto hay que recordar que es conocida la relación que hay entre la células basales del epitelio corneal y los nervios subasales corneales por la cual, mediante factores tróficos como neuropéptidos y neurotransmisores estimulan el crecimiento, proliferación, regeneración, diferenciación y posiblemente la migración celular (106).



# **VI. CONCLUSIONES**

1. La microscopía confocal es un buen método para el estudio, diagnóstico y clasificación de la insuficiencia limbar.
2. La presencia del plexo nervioso subasal corneal, medido con la microscopía confocal, es un factor protector independiente para la neovascularización corneal.
3. La microscopía confocal permite establecer la relación, entre un pannus de más de 180° y superior a 1 mm de invasión corneal, con alteraciones significativas de la maduración epitelial, como la densidad celular y la densidad de nervios del plexo subasal, de forma estadísticamente significativa.
4. En la insuficiencia limbar, diagnosticada mediante microscopía confocal, las aberraciones de alto orden se relacionan positivamente con el pannus corneal.
5. Proponemos una nueva clasificación de la insuficiencia limbar a la luz de los hallazgos encontrados, añadiendo como factor pronóstico a tener en cuenta la presencia del plexo nervioso corneal central (tabla 21).
6. La microscopía confocal nos ha permitido establecer que las densidades de células basales centrales, alares, superficiales y de nervios del plexo nervioso subasal están disminuidas en pacientes con insuficiencia limbar con respecto a controles sanos.
7. La ausencia del plexo nervioso subasal corneal, objetivada con microscopía confocal, y la presencia de pannus corneal, se han relacionado positivamente con la afectación de la córnea central, la tinción tardía persistente con fluoresceína, la



disminución del TBUT, escala de Oxford y Van Bijsterveld, el enrojecimiento limbar temporal y las aberraciones de alto orden.

8. El pannus corneal de forma aislada, se relacionó positivamente con las aberraciones de bajo orden, el enrojecimiento limbar nasal y el brillo corneal apagado.

9. El OSDI tradicional autocumplimentado obtiene los mismos resultados que el OSDI interrogado que se realiza en el Keratograph 5M®.

10. El TBUT y el NIKBUT se correlacionan bien, aunque el NIKBUT obtiene valores más cortos debido a una mayor precocidad en detectar rupturas de la película lagrimal.

11. El test de Schirmer I y la altura del menisco lagrimal en nuestro estudio no tuvieron correlación lineal.

12. El OSDI y el enrojecimiento bulbar medio no mostraron correlación lineal.

13. La altura del menisco lagrimal y el enrojecimiento limbar obtenidos con el Keratograph 5M® se correlacionan de forma positiva con el estadiaje confocal de Deng.

14. La presencia de glándulas de meibomio, el OSDI y el NIKBUT, se correlacionaron de forma negativa con la clasificación confocal de Deng.

15. La osmolarimetría no nos aportó información diagnóstica en nuestro estudio.



## **VII. PUBLICACIONES**

**Capítulo 6. La insuficiencia limbar.** Manuel Caro Magdaleno, Ana Fernández Hortelano, Consuelo Spínola Muñoz. En “Tratamiento actual de las enfermedades mucosinequiantes”. Jesús Montero Iruzubieta. 2015. ISBN: 978-84-89085-58-9. Sociedad Española de Oftalmología.

**Capítulo 17. Tratamiento quirúrgico en la insuficiencia límbica de las enfermedades mucosinequiantes.** Ainhoa Roselló Ferrer, Manuel Caro Magdaleno. En “Tratamiento actual de las enfermedades mucosinequiantes”. Jesús Montero Iruzubieta. 2015. ISBN: 978-84-89085-58-9. Sociedad Española de Oftalmología.



# **VIII. INVESTIGACIONES FUTURAS**

**Confocal y diabéticos.**

**Trasplante de células mesenquimales.**

**Relación de la ausencia de nervios corneales y la sensibilidad corneal en IL**



# **IX. PLAN DE DIFUSIÓN**





# X. BIBLIOGRAFÍA

1. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Limbal Deficiency Syndrome. *Investigacion Clinica*. 2012;53(2): 205-17.
2. Kiessling A, Anderson S. *Human embryonic stem cells*. Boston: Jones and Barlett; 2003.
3. Croxatto JO. Células madre: principios y conceptos. In: Scorsetti DH, Cohen RA, editors. *Células madre en oftalmología: principios, aplicaciones y perspectivas de futuro*. Buenos Aires, Argentina: Ediciones Científicas Argentinas; 2010. p. 182.
4. JE S, M RD, GJ F, K H, JJ R, M L. *Curso de ciencias básicas y clínicas. Enfermedades externas y córnea*. 8: American Academy of Ophthalmology; 2007-2008. p. 58.
5. Shortt AJ, Secker GA, Munro PM, Khaw PT, Tuft SJ, Daniels JT. Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: Novel imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells. *Stem Cells*. 2007;25(6):1402-9.
6. A V. *Atlas of the slitlamp-Microscopy of the Living Eye*. Berlin: Springer; 1921.
7. Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature*. 1971;229(5286):560-1.
8. Goldberg Morton F. B, A. J. Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1982;LXXX(0065-9533 (Print)).
9. AURELL G, KORNERUP T. On glandular structures at the corneo-scleral junction in man and swine; the so-called Manz' glands. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1949;27(1):19-45.
10. Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, Gupta P. Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol*. 2000;48(2):83-92.
11. Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO, Tighe PJ, Joseph A. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol*. 2005;89(5):529-32.
12. Boulton M, Albon J. Stem cells in the eye. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):643-57.
13. Townsend WM. The limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1991;89(0065-9533 (Print)):721-56.
14. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol*. 1986;103(1):49-62.
15. Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*. 1989;57(2):201-9.
16. HANNA C, O'BRIEN JE. Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea. *Arch Ophthalmol*. 1960;64:536-9.
17. HANNA C, BICKNELL DS, O'BRIEN JE. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol*. 1961;65:695-8.
18. British Society for Cell Biology. Symposium (2nd : 1977 : University of Manchester), Lord BI, Potten CS, Cole RJ. *Stem cells and tissue homeostasis : the second Symposium of the British Society for Cell Biology*. Cambridge: Cambridge University Press; 1978. viii, 368 p. p.
19. Potten CS, Morris RJ. Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl*. 1988;10:45-62.
20. Espana EM, Kawakita T Fau - Romano A, Romano A Fau - Di Pascuale M, Di Pascuale M Fau - Smiddy R, Smiddy R Fau - Liu C-y, Liu Cy Fau - Tseng SCG, et al. Stromal niche controls the plasticity of limbal and corneal epithelial differentiation in a rabbit model of recombined tissue. (0146-0404 (Print)).

21. Dua HS. Essentials in Ophthalmology. In: G K, R.N. W, editors. Cornea and External Eye Disease. Germany: Springer; 2006.
22. Buck RC. Cell migration in repair of mouse corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1979;18(8):767-84.
23. Matsuda M, Ubels JL, Edelhauser HF. A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985;26(6):897-900.
24. Dua HS, Forrester JV. The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing. *Am J Ophthalmol*. 1990;110(6):646-56.
25. Srinivasan BD, Eakins KE. The reepithelialization of rabbit cornea following single and multiple denudation. *Exp Eye Res*. 1979;29(6):595-600.
26. Dua HS, Gomes JA, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol*. 1994;78(5):401-8.
27. Friedenwald JS, Buschke W. Some Factors Concerned in the Mitotic and Wound-Healing Activities of the Corneal Epithelium. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1944;42:371-83.
28. Ebato B, Friend J, Thoft RA. Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1987;28(9):1450-6.
29. Zieske JD, Bukusoglu G, Yankauckas MA. Characterization of a potential marker of corneal epithelial stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33(1):143-52.
30. Zieske JD, Wasson M. Regional variation in distribution of EGF receptor in developing and adult corneal epithelium. *J Cell Sci*. 1993;106 ( Pt 1):145-52.
31. Lauweryns B, van den Oord JJ, De Vos R, Missotten L. A new epithelial cell type in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34(6):1983-90.
32. Gipson IK, Kiorpes TC. Epithelial sheet movement: protein and glycoprotein synthesis. *Dev Biol*. 1982;92(1):259-62.
33. Dong Y, Roos M, Gruijters T, Donaldson P, Bullivant S, Beyer E, et al. Differential expression of two gap junction proteins in corneal epithelium. *Eur J Cell Biol*. 1994;64(1):95-100.
34. Kasper M, Moll R, Stosiek P, Karsten U. Patterns of cytokeratin and vimentin expression in the human eye. *Histochemistry*. 1988;89(4):369-77.
35. Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, De Luca M. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(27):9523-8.
36. Schlötzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, Sorokin L, Sasaki T, Paulsson M, et al. Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. *Exp Eye Res*. 2007;85(6):845-60.
37. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*. 2001;7(9):1028-34.
38. Arpitha P, Prajna Nv Fau - Srinivasan M, Srinivasan M Fau - Muthukkaruppan V, Muthukkaruppan V. High expression of p63 combined with a large N/C ratio defines a subset of human limbal epithelial cells: implications on epithelial stem cells. (0146-0404 (Print)).
39. Barrandon Y Fau - Green H, Green H. Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. (0027-8424 (Print)).
40. Chen Z, de Paiva Cs Fau - Luo L, Luo L Fau - Kretzer FL, Kretzer Fl Fau - Pflugfelder SC, Pflugfelder Sc Fau - Li D-Q, Li DQ. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. (1066-5099 (Print)).
41. Romano AC, Espana Em Fau - Yoo SH, Yoo Sh Fau - Budak MT, Budak Mt Fau - Wolosin JM, Wolosin Jm Fau - Tseng SCG, Tseng SC. Different cell sizes in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry. (0146-0404 (Print)).

42. Kawasaki S, Tanioka H, Yamasaki K, Yokoi N, Komuro A, Kinoshita S. Clusters of corneal epithelial cells reside ectopically in human conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(4):1359-67.
43. Yeung AM, Tint NL, Kulkarni BB, Mohammed I, Suleman H, Hopkinson A, et al. Infant limbus: an immunohistological study. *Exp Eye Res*. 2009;88(6):1161-4.
44. Zheng T, Xu J. Age-related changes of human limbus on in vivo confocal microscopy. *Cornea*. 2008;27(7):782-6.
45. Zarei-Ghanavati S, Ramirez-Miranda A, Deng SX. Limbal lacuna: a novel limbal structure detected by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging : the official journal of the International Society for Imaging in the Eye*. 2011;42 Online:e129-31.
46. Mills JC, Gordon JL. The intestinal stem cell niche: there grows the neighborhood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;Oct 23;98(22)(0027-8424 (Print)):12334-6.
47. Bjerknes M, Cheng H. Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;Oct 23(98(22)):12497-502.
48. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000;287(5457):1427-30.
49. Alberto Arntz Bustos JADdlC. Anatomía funcional de la superficie ocular. In: José M. Benítez del Castillo Sánchez JADdlC, María Teresa Rodríguez Ares, editor. *Superficie Ocular*. Sociedad Española de Oftalmología ed: Sociedad Española de Oftalmología; 2004. p. 1-12.
50. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea*. 3rd ed. St. Louis, Mo.: Mosby/Elsevier; 2011.
51. Pfister RR. The normal surface of corneal epithelium: a scanning electron microscopic study. *Invest Ophthalmol*. 1973;12(9):654-68.
52. Belmonte C, Acosta MC, Schmelz M, Gallar J. Measurement of corneal sensitivity to mechanical and chemical stimulation with a CO2 esthesiometer. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(2):513-9.
53. Teson M, Calonge M, Fernandez I, Stern ME, Gonzalez-Garcia MJ. Characterization by Belmonte's gas esthesiometer of mechanical, chemical, and thermal corneal sensitivity thresholds in a normal population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(6):3154-60.
54. Cochet P, Bonnet R. L'esthesie corneene: sa mesure clinique: ses variations physiologiques et pathologiques. *La Clinique Ophthalmol*. 1960(4):3-27.
55. Garcia I, Etxebarria J, Boto-de-Los-Bueis A, Diaz-Valle D, Rivas L, Martinez-Soraa I, et al. Comparative Study of Limbal Stem Cell Deficiency Diagnosis Methods: Detection of MUC5AC mRNA and Goblet Cells in Corneal Epithelium. *Ophthalmology*. 2012;119(5):923-9.
56. Donisi PM, Rama P, Fasolo A, Ponzin D. Analysis of limbal stem cell deficiency by corneal impression cytology. *Cornea*. 2003;22(6):533-8.
57. Pe'er J, Zajicek G, Greifner H, Kogan M. Streaming conjunctiva. *Anat Rec*. 1996;245(1):36-40.
58. Krenzer KL, Freddo TF. Cytokeratin expression in normal human bulbar conjunctiva obtained by impression cytology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(1):142-52.
59. Scorsetti DH, Cohen RA. Células madre y superficie corneal. In: Scorsetti DH, Cohen RA, editors. *Células madre en oftalmología: principios, aplicaciones y perspectivas de futuro*. Buenos Aires, Argentina: Ediciones científicas argentinas; 2010. p. 35-47.
60. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1983;24(10):1442-3.
61. Tseng SCG, Sun TT. Stem cells:ocular surface maintenance. In: Brightbill FS, editor. *Corneal surgery:Theory, Technique, and Tissue*, 3rd ed. 3rd ed1999.

62. Tseng SC. Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells. *Mol Biol Rep.* 1996;23(1):47-58.
63. Touhami A, Grueterich M, Tseng SC. The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(4):987-94.
64. Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathol.* 2002;197(4):419-23.
65. Bishop AE, Buttery LD, Polak JM. Embryonic stem cells. *J Pathol.* 2002;197(4):424-9.
66. Satake Y, Higa K, Tsubota K, Shimazaki J. Long-term outcome of cultivated oral mucosal epithelial sheet transplantation in treatment of total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology.* 118. United States: 2011 American Academy of Ophthalmology. Published by Elsevier Inc; 2011. p. 1524-30.
67. Leblond CP. The life history of cells in renewing systems. *Am J Anat.* 1981;160(2):114-58.
68. Kruse F. Classification of ocular surface disease. In: Holland EJ, Mannis MJ, editors. *Ocular Surface Disease: Medical and Surgical Management.* New York: springer-Verlag; 2002. p. 16-36.
69. Lehrer MS, Sun Tt Fau - Lavker RM, Lavker RM. Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *J Cell Sci.* 1998;111:2867-75.
70. Dua HS, Joseph A, Shanmuganathan VA, Jones RE. Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye (Lond).* 2003;17(8):877-85.
71. Chang J, DT A, HC H-q. Characterization of angiostatin in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(Suppl).
72. Friend J, Thoft RA. Functional competence of regenerating ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1978;17(2):134-9.
73. Buck RC. Ultrastructure of conjunctival epithelium replacing corneal epithelium. *Curr Eye Res.* 1986;5(2):149-59.
74. Puangsricharern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology.* 1995;102(10):1476-85.
75. Sacchetti M, Lambiasi A, Cortes M, Sgrulletta R, Bonini S, Merlo D. Clinical and cytological findings in limbal stem cell deficiency. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005;243(9):870-6.
76. Jesús Merayo-Llodes RT, Alejandro Berra. Estudios de laboratorio en superficie ocular. In: José M. Benítez del Castillo Sánchez JADdlC, María Teresa Rodríguez Ares, editor. *Superficie Ocular.* Sociedad Española de Oftalmología ed: Sociedad Española de Oftalmología; 2004. p. 13-22.
77. Garcia I, Etxebarria J, Boto-de-Los-Bueis A, Díaz-Valle D, Rivas L, Martínez-Sorola I, et al. Comparative study of limbal stem cell deficiency diagnosis methods: detection of MUC5AC mRNA and goblet cells in corneal epithelium. *Ophthalmology.* 2012;119(5):923-9.
78. Deng SX, Sejpal KD, Tang Q, Aldave AJ, Lee OL, Yu F. Characterization of Limbal Stem Cell Deficiency by In Vivo Laser Scanning Confocal Microscopy. *Archives of Ophthalmology.* 2012;130(4):440-5.
79. Garcia I, Etxebarria J, Merayo-Llodes J, Torras J, Boto-de-los-Bueis A, Diaz-Valle D, et al. Novel Molecular Diagnostic System of Limbal Stem Cell Deficiency Based on MUC5AC Transcript Detection in Corneal Epithelium by PCR-Reverse Dot Blot. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2013;54(8):5643-52.
80. Cavanagh HD, El-Agha MS, Petroll WM, Jester JV. Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. *Cornea.* 2000;19(5):712-22.
81. Szaflik JP. Comparison of in vivo confocal microscopy of human cornea by white light scanning slit and laser scanning systems. *Cornea.* 2007;26(4):438-45.

82. H. G. Spaltlampenphotographie und – photometric. *Ophthalmologica*. 1939;98(5-6):257-70.
83. Minsky M. US 3013467 A. Microscopy apparatus. USA: Google Patents; Presentada 1957, Publicada 1961.
84. Petri M, Hadravsky M, Egger MD, Galambos R. Tandem-Scanning Reflected-Light Microscope. *J Opt Soc Am*. 1968;58(5):661-4.
85. Cavanagh HD, Jester JV, Essepian J, Shields W, Lemp MA. Confocal microscopy of the living eye. *Clao j*. 1990;16(1):65-73.
86. Efron N. Contact lens-induced changes in the anterior eye as observed in vivo with the confocal microscope. *Prog Retin Eye Res*. 2007;26(4):398-436.
87. Patel DV, McGhee CN. Contemporary in vivo confocal microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques: a major review. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2007;35(1):71-88.
88. Li HF, Petroll WM, Moller-Pedersen T, Maurer JK, Cavanagh HD, Jester JV. Epithelial and corneal thickness measurements by in vivo confocal microscopy through focusing (CMTF). *Curr Eye Res*. 1997;16(3):214-21.
89. McLaren JW, Nau CB, Erie JC, Bourne WM. Corneal thickness measurement by confocal microscopy, ultrasound, and scanning slit methods. *Am J Ophthalmol*. 2004;137(6):1011-20.
90. Cuadros Celorrio M, Villegas Portero R, A LMn. Microscopía confocal en oftalmología Informe de síntesis de tecnología emergente. In: Andalucía AdEndTaSd, editor. Sevilla, España: Gandulfo impresores, Sevilla; 2007.
91. Petroll WM, Robertson DM. In Vivo Confocal Microscopy of the Cornea: New Developments in Image Acquisition, Reconstruction, and Analysis Using the HRT-Rostock Corneal Module. *Ocul Surf*. 2015;13(3):187-203.
92. Erie JC, McLaren JW, Patel SV. Confocal microscopy in ophthalmology. *Am J Ophthalmol*. 2009;148(5):639-46.
93. BE. O, L. S, NR. H. *Ocular Therapeutics Handbook: A Clinical Manual*: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
94. Parissi M, Karanis G, Randjelovic S, Germundsson J, Poletti E, Ruggeri A, et al. Standardized baseline human corneal subbasal nerve density for clinical investigations with laser-scanning in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(10):7091-102.
95. Erie EA, McLaren JW, Kittleson KM, Patel SV, Erie JC, Bourne WM. Corneal subbasal nerve density: a comparison of two confocal microscopes. *Eye & contact lens*. 2008;34(6):322-5.
96. Patel DV, McGhee CN. Mapping of the normal human corneal sub-Basal nerve plexus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(12):4485-8.
97. Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, McGhee CN. Age-related differences in the normal human cornea: a laser scanning in vivo confocal microscopy study. *Br J Ophthalmol*. 2007;91(9):1165-9.
98. Lagali N, Eden U, Utheim TP, Chen X, Riise R, Dellby A, et al. In Vivo Morphology of the Limbal Palisades of Vogt Correlates With Progressive Stem Cell Deficiency in Aniridia-Related Keratopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2013;54(8):5333-42.
99. Grupcheva CN, Wong T, Riley AF, McGhee CN. Assessing the sub-basal nerve plexus of the living healthy human cornea by in vivo confocal microscopy. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2002;30(3):187-90.
100. Benitez del Castillo JM, Wasfy MA, Fernandez C, Garcia-Sanchez J. An in vivo confocal masked study on corneal epithelium and subbasal nerves in patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(9):3030-5.
101. Erie JC, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. The effect of age on the corneal subbasal nerve plexus. *Cornea*. 2005;24(6):705-9.

102. Eckard A, Stave J, Guthoff RF. In vivo investigations of the corneal epithelium with the confocal Rostock Laser Scanning Microscope (RLSM). *Cornea*. 2006;25(2):127-31.
103. Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboorn S, Tan AL, Doubrava MW, Kim CK. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea*. 1998;17(5):485-92.
104. Vanathi M, Tandon R, Sharma N, Titiyal JS, Pandey RM, Vajpayee RB. In-vivo slit scanning confocal microscopy of normal corneas in Indian eyes. *Indian J Ophthalmol*. 2003;51(3):225-30.
105. Miri A, Alomar T, Nubile M, Al-Aqaba M, Lanzini M, Fares U, et al. In vivo confocal microscopic findings in patients with limbal stem cell deficiency. *British Journal of Ophthalmology*. 2012;96(4):523-9.
106. Garcia-Hirschfeld J, Lopez-Briones LG, Belmonte C. Neurotrophic influences on corneal epithelial cells. *Exp Eye Res*. 1994;59(5):597-605.
107. You L, Kruse FE, Völcker HE. Neurotrophic factors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(3):692-702.
108. Ferrari G, Hajrasouliha AR, Sadrai Z, Ueno H, Chauhan SK, Dana R. Nerves and neovessels inhibit each other in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(1):813-20.
109. Guthoff RF, Baudouin C, Stave J. *Atlas of Confocal Laser Scanning In-vivo Microscopy* in. Berlin, Heidelberg |bSpringer-Verlag Berlin Heidelberg.
110. Scarpa F, Grisan E, Ruggeri A. Automatic recognition of corneal nerve structures in images from confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(11):4801-7.
111. Patel DV, McGhee CN. Mapping the corneal sub-basal nerve plexus in keratoconus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(4):1348-51.
112. Mathers WD, Nelson SE, Lane JL, Wilson ME, Allen RC, Folberg R. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Arch Ophthalmol*. 2000;118(2):178-83.
113. Kanavi MR, Javadi M, Yazdani S, Mirdehghanm S. Sensitivity and specificity of confocal scan in the diagnosis of infectious keratitis. *Cornea*. 2007;26(7):782-6.
114. Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R. In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the normal human corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2005;243(10):1056-61.
115. Cruzat A, Pavan-Langston D, Hamrah P. In vivo confocal microscopy of corneal nerves: analysis and clinical correlation. *Semin Ophthalmol*. 2010;25(5-6):171-7.
116. Tavakoli M, Mitu-Pretorian M, Petropoulos IN, Fadavi H, Asghar O, Alam U, et al. Corneal confocal microscopy detects early nerve regeneration in diabetic neuropathy after simultaneous pancreas and kidney transplantation. *Diabetes*. 2013;62(1):254-60.
117. Misra SL, Craig JP, Patel DV, McGhee CN, Pradhan M, Ellyett K, et al. In Vivo Confocal Microscopy of Corneal Nerves: An Ocular Biomarker for Peripheral and Cardiac Autonomic Neuropathy in Type 1 Diabetes Mellitus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(9):5060-5.
118. Tavakoli M, Kallinikos P, Iqbal A, Herbert A, Fadavi H, Efron N, et al. Corneal confocal microscopy detects improvement in corneal nerve morphology with an improvement in risk factors for diabetic neuropathy. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2011;28(10):1261-7.
119. Holmes TJ, Pellegrini M, Miller C, Epplin-Zapf T, Larkin S, Luccarelli S, et al. Automated software analysis of corneal micrographs for peripheral neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(9):4480-91.
120. Zhivov A, Winter K, Hovakimyan M, Peschel S, Harder V, Schober HC, et al. Imaging and quantification of subbasal nerve plexus in healthy volunteers and diabetic patients with or without retinopathy. *PLoS One*. 2013;8(1):e52157.

121. Edwards K, Pritchard N, Vagenas D, Russell A, Malik RA, Efron N. Standardizing corneal nerve fibre length for nerve tortuosity increases its association with measures of diabetic neuropathy. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2014;31(10):1205-9.
122. Petropoulos IN, Ferdousi M, Marshall A, Alam U, Ponirakis G, Azmi S, et al. The Inferior Whorl For Detecting Diabetic Peripheral Neuropathy Using Corneal Confocal Microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(4):2498-504.
123. Quattrini C, Tavakoli M, Jeziorska M, Kallinikos P, Tesfaye S, Finnigan J, et al. Surrogate markers of small fiber damage in human diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2007;56(8):2148-54.
124. Midená E, Brugin E, Ghirlando A, Somnavilla M, Avogaro A. Corneal diabetic neuropathy: a confocal microscopy study. *Journal of refractive surgery (Thorofare, NJ : 1995)*. 2006;22(9 Suppl):S1047-52.
125. Cottrell P, Ahmed S, James C, Hodson J, McDonnell PJ, Rauz S, et al. Neuron J is a rapid and reliable open source tool for evaluating corneal nerve density in herpes simplex keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(11):7312-20.
126. Marre M. [On the age dependence of the healing of corneal epithelium defects]. *Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie Albrecht von Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*. 1967;173(3):250-5.
127. Millodot M. The influence of age on the sensitivity of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1977;16(3):240-2.
128. Roszkowska AM, Colosi P, Ferreri FM, Galasso S. Age-related modifications of corneal sensitivity. *Ophthalmologica*. 2004;218(5):350-5.
129. Kawabuchi M, Chongjian Z, Islam AT, Hirata K, Nada O. The effect of aging on the morphological nerve changes during muscle reinnervation after nerve crush. *Restorative neurology and neuroscience*. 1998;13(3-4):117-27.
130. Scarpa F, Zheng X, Ohashi Y, Ruggeri A. Automatic evaluation of corneal nerve tortuosity in images from in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(9):6404-8.
131. Hertz P, Bril V, Orszag A, Ahmed A, Ng E, Nwe P, et al. Reproducibility of in vivo corneal confocal microscopy as a novel screening test for early diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2011;28(10):1253-60.
132. Rosenberg ME, Tervo TM, Immonen IJ, Muller LJ, Gronhagen-Riska C, Vesaluoma MH. Corneal structure and sensitivity in type 1 diabetes mellitus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(10):2915-21.
133. Tavakoli M, Quattrini C, Abbott C, Kallinikos P, Marshall A, Finnigan J, et al. Corneal confocal microscopy: a novel noninvasive test to diagnose and stratify the severity of human diabetic neuropathy. *Diabetes care*. 2010;33(8):1792-7.
134. Tavakoli M, Marshall A, Pitceathly R, Fadavi H, Gow D, Roberts ME, et al. Corneal confocal microscopy: a novel means to detect nerve fibre damage in idiopathic small fibre neuropathy. *Experimental neurology*. 2010;223(1):245-50.
135. Messmer EM, Schmid-Tannwald C, Zapp D, Kampik A. In vivo confocal microscopy of corneal small fiber damage in diabetes mellitus. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2010;248(9):1307-12.
136. Patel DV, McGhee CN. In vivo laser scanning confocal microscopy confirms that the human corneal sub-basal nerve plexus is a highly dynamic structure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(8):3409-12.
137. Edwards K, Pritchard N, Gosschalk K, Sampson GP, Russell A, Malik RA, et al. Wide-field assessment of the human corneal subbasal nerve plexus in diabetic neuropathy using a novel mapping technique. *Cornea*. 2012;31(9):1078-82.

138. Lum E, Golebiowski B, Swarbrick HA. Mapping the corneal sub-basal nerve plexus in orthokeratology lens wear using in vivo laser scanning confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(4):1803-9.
139. Misra S, Craig JP, McGhee CN, Patel DV. Interocular comparison by in vivo confocal microscopy of the 2-dimensional architecture of the normal human corneal subbasal nerve plexus. *Cornea.* 2012;31(12):1376-80.
140. Turuwhenua JT, Patel DV, McGhee CN. Fully automated montaging of laser scanning in vivo confocal microscopy images of the human corneal subbasal nerve plexus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(4):2235-42.
141. Allgeier S, Maier S, Mikut R, Peschel S, Reichert KM, Stachs O, et al. Mosaicking the subbasal nerve plexus by guided eye movements. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(9):6082-9.
142. Steinle JJ, Pierce JD, Clancy RL, P GS. Increased ocular blood vessel numbers and sizes following chronic sympathectomy in rat. *Exp Eye Res.* 2002;74(6):761-8.
143. Basu S, Sarkar C, Chakroborty D, Nagy J, Mitra RB, Dasgupta PS, et al. Ablation of peripheral dopaminergic nerves stimulates malignant tumor growth by inducing vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer research.* 2004;64(16):5551-5.
144. Ambati B, Md P. *Adventures in Corneal Avascularity* Copyright (C) 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.: Department of Ophthalmology, Moran Eye Center, University of Utah, Salt Lake City, UT.; 2015 [cited 34 dsn, 8216186]. S112]. Available from: <http://0-ovidsp.ovid.com.fama.us.es/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=ovftq&NEWS=N&AN=00003226-201511001-00003>.
145. Lazarovici P, Gazit A, Staniszewska I, Marcinkiewicz C, Lelkes PI. Nerve growth factor (NGF) promotes angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane. *Endothelium : journal of endothelial cell research.* 2006;13(1):51-9.
146. Meyer C, Notari L, Becerra SP. Mapping the type I collagen-binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277(47):45400-7.
147. Cruzat A, Witkin D, Baniyadi N, Zheng L, Ciolino JB, Jurkunas UV, et al. Inflammation and the nervous system: the connection in the cornea in patients with infectious keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(8):5136-43.
148. Muller RT, Abedi F, Cruzat A, Witkin D, Baniyadi N, Cavalcanti BM, et al. Degeneration and Regeneration of Subbasal Corneal Nerves after Infectious Keratitis: A Longitudinal In Vivo Confocal Microscopy Study. *Ophthalmology.* 2015.
149. Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea - a major review. *Clinical & experimental ophthalmology.* 2009;37(1):100-17.
150. Ichijima H, Petroll WM, Jester JV, Cavanagh HD. Confocal microscopic studies of living rabbit cornea treated with benzalkonium chloride. *Cornea.* 1992;11(3):221-5.
151. Zhivov A, Beck R, Guthoff RF. Corneal and conjunctival findings after mitomycin C application in pterygium surgery: an in-vivo confocal microscopy study. *Acta Ophthalmol.* 2009;87(2):166-72.
152. Ichijima H, Petroll WM, Jester JV, Ohashi J, Cavanagh HD. Effects of increasing Dk with rigid contact lens extended wear on rabbit corneal epithelium using confocal microscopy. *Cornea.* 1992;11(4):282-7.
153. Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R. In vivo confocal microscopic evaluation of langerhans cell density and distribution in the corneal epithelium of healthy volunteers and contact lens wearers. *Cornea.* 2007;26(1):47-54.



154. Mazzotta C, Balestrazzi A, Traversi C, Baiocchi S, Caporossi T, Tommasi C, et al. Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: ultrastructural analysis by Heidelberg Retinal Tomograph II in vivo confocal microscopy in humans. *Cornea*. 2007;26(4):390-7.
155. Caporossi A, Baiocchi S, Mazzotta C, Traversi C, Caporossi T. Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin-ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen: preliminary refractive results in an Italian study. *J Cataract Refract Surg*. 2006;32(5):837-45.
156. Messmer. In Vivo Confocal Microscopy in Healthy Conjunctiva, Conjunctivitis, and Conjunctival Tumors. In: Reinhard T, F. L, editors. *Cornea and External Eye Disease*: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 217-27.
157. N. L. Confocal Laser Microscopy - Principles and Applications in Medicine, Biology, and the Food Sciences. InTech, editor2013.
158. Labbe A, Dupas B, Hamard P, Baudouin C. In vivo confocal microscopy study of blebs after filtering surgery. *Ophthalmology*. 2005;112(11):1979.
159. Scope A, Barzilai A, Zilinsky I. [Clinical utility of reflectance confocal microscopy for the non-invasive diagnosis of lentigo maligna melanoma]. *Harefuah*. 2014;153(5):248-52, 306.
160. Cinotti E, Perrot J-L, Labeille B, Campolmi N, Espinasse M, Grivet D, et al. Original article: Handheld Reflectance Confocal Microscopy for the Diagnosis of Conjunctival Tumors.
161. Steven P, Muller M, Koop N, Rose C, Huttmann G. Comparison of Cornea Module and DermaInspect for noninvasive imaging of ocular surface pathologies. *Journal of biomedical optics*. 2009;14(6):064040.
162. Morcillo-Laiz R, Muñoz-Negrete F, Durán-Poveda S. La cámara Scheimpflug rotacional Pentacam. *Studium Ophthalmologicum*. 2006;XXIV(4).
163. Maeda N. Clinical applications of wavefront aberrometry - a review. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2009;37(1):118-29.
164. McMahon TT, Szczołka-Flynn L, Barr JT, Anderson RJ, Slaughter ME, Lass JH, et al. A new method for grading the severity of keratoconus: the Keratoconus Severity Score (KSS). *Cornea*. 2006;25(7):794-800.
165. Rojo A, Paris E. [Instruments of the Saracibar Museum (I.O.B.A.). The Placido's disc]. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2008;83(5):335-6.
166. Tung CI, Perin AF, Gumus K, Pflugfelder SC. Tear meniscus dimensions in tear dysfunction and their correlation with clinical parameters. *Am J Ophthalmol*. 2014;157(2):301-10.e1.
167. Korb DR. Survey of preferred tests for diagnosis of the tear film and dry eye. *Cornea*. 2000;19(4):483-6.
168. Smith J, Nichols KK, Baldwin EK, Kimelblatt S. Current patterns in the use of diagnostic tests in dry eye evaluation. *Cornea*. 2008;27(6):656-62.
169. Nichols KK, Nichols JJ, Zadnik K. Frequency of Dry Eye Diagnostic Test Procedures Used in Various Modes of Ophthalmic Practice. *Cornea*. 2000;19(4):477-82.
170. Bron AJ. Diagnosis of Dry Eye. *Survey of Ophthalmology*. 2001;45:S221-S6.
171. Ares TR. Exploración clínica. In: José M. Benítez del Castillo Sánchez JADdIC, María Teresa Rodríguez Ares, editor. *Superficie Ocular*. LXXX Ponencia Oficial de la Sociedad Española de Oftalmología: Sociedad Española de Oftalmología; 2004. p. 23-8.
172. Lozato PA, Pisella PJ, Tixier J, Guillon JP, Baudouin C. [Clinical exploration of the lipid phase of the laryngeal film using Tearscope plus]. *Journal francais d'ophtalmologie*. 1999;22(4):475-80.
173. Mengher LS, Bron AJ, Tonge SR, Gilbert DJ. Effect of fluorescein instillation on the pre-corneal tear film stability. *Curr Eye Res*. 1985;4(1):9-12.

174. Pflugfelder SC, Tseng SC, Sanabria O, Kell H, Garcia CG, Felix C, et al. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea*. 1998;17(1):38-56.
175. Goto T, Zheng X, Okamoto S, Ohashi Y. Tear film stability analysis system: introducing a new application for videokeratography. *Cornea*. 2004;23(8 Suppl):S65-70.
176. Vanley GT, Leopold IH, Gregg TH. Interpretation of tear film breakup. *Arch Ophthalmol*. 1977;95(3):445-8.
177. Mengher LS, Bron AJ, Tonge SR, Gilbert DJ. A non-invasive instrument for clinical assessment of the pre-corneal tear film stability. *Curr Eye Res*. 1985;4(1):1-7.
178. Lee JH, Kee CW. The significance of tear film break-up time in the diagnosis of dry eye syndrome. *Korean J Ophthalmol*. 1988;2(2):69-71.
179. Sweeney DF, Millar TJ, Raju SR. Tear film stability: a review. *Exp Eye Res*. 2013;117:28-38.
180. Liu Z, Pflugfelder SC. Corneal surface regularity and the effect of artificial tears in aqueous tear deficiency. *Ophthalmology*. 1999;106(5):939-43.
181. Goto T, Zheng X, Klyce SD, Kataoka H, Uno T, Karon M, et al. A new method for tear film stability analysis using videokeratography. *Am J Ophthalmol*. 2003;135(5):607-12.
182. Gumus K, Crockett CH, Rao K, Yeu E, Weikert MP, Shirayama M, et al. Noninvasive assessment of tear stability with the tear stability analysis system in tear dysfunction patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(1):456-61.
183. Best N, Drury L, Wolffsohn JS. Clinical evaluation of the Oculus Keratograph. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2012;35(4):171-4.
184. Hong J, Sun X, Wei A, Cui X, Li Y, Qian T, et al. Assessment of tear film stability in dry eye with a newly developed keratograph. *Cornea*. 2013;32(5):716-21.
185. Baudouin C, Barton K, Cucherat M, Traverso C. The measurement of bulbar hyperemia: challenges and pitfalls. *Eur J Ophthalmol*. 2015;25(4):273-9.
186. Amparo F, Wang H, Emami-Naeini P, Karimian P, Dana R. The Ocular Redness Index: a novel automated method for measuring ocular injection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(7):4821-6.
187. Wu S, Hong J, Tian L, Cui X, Sun X, Xu J. Assessment of Bulbar Redness with a Newly Developed Keratograph. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry*. 2015;92(8):892-9.
188. JG W, MM R, KL S. Evaluating the functional impact of dry eye: the Ocular Surface Disease Index [abstract]. *Drug Inf J*. 1997;31, October(Quality of Life Evaluation Abstracts):1436.
189. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol*. 2000;118(5):615-21.
190. Vitale S, Goodman LA, Reed GF, Smith JA. Comparison of the NEI-VFQ and OSDI questionnaires in patients with Sjogren's syndrome-related dry eye. *Health and quality of life outcomes*. 2004;2:44.
191. Morales-Fernandez L, Perez-Alvarez J, Garcia-Catalan R, Benitez-del-Castillo JM, Garcia-Sanchez J. [Clinical- histological correlation in patients with dry eye]. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2010;85(7):239-45.
192. Diaz-Valle D, Arriola-Villalobos P, Garcia-Vidal SE, Sanchez-Pulgarin M, Borrego Sanz L, Gegundez-Fernandez JA, et al. Effect of lubricating eyedrops on ocular light scattering as a measure of vision quality in patients with dry eye. *J Cataract Refract Surg*. 2012;38(7):1192-7.
193. Garcia-Feijoo J, Sampaolesi JR. A multicenter evaluation of ocular surface disease prevalence in patients with glaucoma. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)*. 2012;6:441-6.

194. Ramli N, Supramaniam G, Samsudin A, Juana A, Zahari M, Choo MM. Ocular Surface Disease in Glaucoma: Effect of Polypharmacy and Preservatives. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry*. 2015;92(9):e222-6.
195. Gao S, Wu J, Li L, Wang Y, Zhong X. Effects of silicone hydrogel contact lenses on ocular surface after Sub-Bowman's Keratomileusis. *Curr Eye Res*. 2013;38(11):1118-23.
196. Theophanous C, Irvine JA, Parker P, Chiu GB. Use of Prosthetic Replacement of the Ocular Surface Ecosystem Scleral Lenses in Patients with Ocular Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015.
197. Huang D, Luo Q, Yang H, Mao Y. Changes of lacrimal gland and tear inflammatory cytokines in thyroid-associated ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(8):4935-43.
198. Kocabeyoglu S, Mocan MC, Cevik Y, Irkec M. Ocular Surface Alterations and In Vivo Confocal Microscopic Features of Corneas in Patients With Newly Diagnosed Graves' Disease. *Cornea*. 2015;34(7):745-9.
199. Yao W, Liang Q, Sun X, Wang N, Antoine L. [Evaluation of the diagnostic value for meibomian gland dysfunction examinations]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2014;50(4):247-53.
200. Hong J, Yu Z, Cui X, Qian T, Le Q, Wei A, et al. Meibomian Gland Alteration in Patients with Primary Chronic Dacryocystitis: An In vivo Confocal Microscopy Study. *Curr Eye Res*. 2015;40(8):772-9.
201. Torricelli AA, Matsuda M, Novaes P, Braga AL, Saldiva PH, Alves MR, et al. Effects of ambient levels of traffic-derived air pollution on the ocular surface: analysis of symptoms, conjunctival goblet cell count and mucin 5AC gene expression. *Case reports in ophthalmological medicine*. 2014;131:59-63.
202. Acar M, Firat H, Acar U, Ardic S. Ocular surface assessment in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung*. 2013;17(2):583-8.
203. Amparo F, Schaumberg DA, Dana R. Comparison of Two Questionnaires for Dry Eye Symptom Assessment: The Ocular Surface Disease Index and the Symptom Assessment in Dry Eye. *Ophthalmology*. 2015;122(7):1498-503.
204. Mackman G, Brightbill FS, Optiz JM. Corneal changes in aniridia. *Am J Ophthalmol*. 1979;87(4):497-502.
205. Pfister RR. Corneal stem cell disease: concepts, categorization, and treatment by auto- and homotransplantation of limbal stem cells. *CLAO J*. 1994;20(1):64-72.
206. Teresa Rodríguez Ares RTP. Clasificación de deficiencias de limbo. In: José M. Benítez del Castillo Sánchez JADdlC, María Teresa Rodríguez Ares, editor. *Superficie Ocular: Sociedad Española de Oftalmología*; 2004. p. 29-36.
207. Gris O, Perez-Santonja JJ, J.L G. Alteraciones del limbo esclero-corneal y aniridia. In: Alvarez de Toledo J, Gris O, Teus M, editors. *Protocolos de actuación en pacientes con aniridia* 2008. p. 73-96.
208. Lopez-Garcia JS, Rivas L, Garcia-Lozano I. Corneal epithelium squamous metaplasia determination as diagnostic factor in limbal deficiency. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia*. 2006;81(5):281-8.
209. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal Stem-Cell Therapy and Long-Term Corneal Regeneration. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(2):147-55.
210. Schwartz G, Gomes JP, Holland E. Preoperative Staging of Disease Severity. *Ocular Surface Disease Medical and Surgical Management: Springer New York*; 2002. p. 158-67.

211. Schwartz GS GJ, Holland EJ. Preoperative Staging of Disease Severity. In: Mannis MJ HE, editor. *Ocular Surface Disease: Medical and Surgical Management*. New York: Springer-Verlag; 2002. p. 158-67.
212. Javier Mendicute SA, Itziar Martínez-Soraa. Causticaciones de la superficie ocular. In: José M. Benítez del Castillo Sánchez JADdlC, María Teresa Rodríguez Ares, editor. *Superficie Ocular*. LXXX Ponencia Oficial de la Sociedad Española de Oftalmología: Sociedad Española de Oftalmología; 2004. p. 127-42.
213. Tseng SC. Concept and application of limbal stem cells. *Eye (Lond)*. 1989;3 ( Pt 2):141-57.
214. Poon AC, Geerling G, Dart JK, Fraenkel GE, Daniels JT. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(10): 1188-97.
215. Alvarado Valero MC, Martínez Toldos JJ, Borrás Blasco J, Almiñana Almiñana A, Pérez Ramos JM. [Treatment of persistent epithelial defects using autologous serum application]. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2004;79(11):537-42.
216. Noble BA, Loh RS, MacLennan S, Pesudovs K, Reynolds A, Bridges LR, et al. Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomised controlled crossover trial for ocular surface disease. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(5):647-52.
217. Pires RT, Tseng SC, Prabhasawat P, Puangsricharn V, Maskin SL, Kim JC, et al. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol*. 1999;117(10): 1291-7.
218. Lopez-Garcia JS, Rivas L, Garcia-Lozano I. [Moderate limbal deficiency in patients with congenital aniridia treated with amniotic membrane transplantation]. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2005;80(9):517-23.
219. Solomon A, Pires RT, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation after extensive removal of primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology*. 2001;108(3):449-60.
220. Sridhar MS, Bansal AK, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation in acute chemical and thermal injury. *Am J Ophthalmol*. 2000;130(1):134-7.
221. Gomes JA, dos Santos MS, Cunha MC, Mascaro VL, Barros Jde N, de Sousa LB. Amniotic membrane transplantation for partial and total limbal stem cell deficiency secondary to chemical burn. *Ophthalmology*. 2003;110(3):466-73.
222. Barabino S, Rolando M, Bentivoglio G, Mingari C, Zanardi S, Bellomo R, et al. Role of amniotic membrane transplantation for conjunctival reconstruction in ocular-cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology*. 2003;110(3):474-80.
223. Gomes JA, Santos MS, Ventura AS, Donato WB, Cunha MC, Hofling-Lima AL. Amniotic membrane with living related corneal limbal/conjunctival allograft for ocular surface reconstruction in Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol*. 2003;121(10):1369-74.
224. Meller D, Dabul V, Tseng SC. Expansion of conjunctival epithelial progenitor cells on amniotic membrane. *Exp Eye Res*. 2002;74(4):537-45.
225. Calonge M, Boto A. Terapias avanzadas. In: oftalmología SEd, editor. *Insuficiencia Limbar*; 23 de Septiembre de 2015; Sevilla2015.
226. Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 1989;96(5):709-22; discussion 22-3.
227. Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, et al. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 1999;340(22):1697-703.
228. Basti S, Rao SK. Current status of limbal conjunctival autograft. *Curr Opin Ophthalmol*. 2000;11(4):224-32.

229. Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K. Donor source affects the outcome of ocular surface reconstruction in chemical or thermal burns of the cornea. *Ophthalmology*. 111. United States 2004. p. 38-44.
230. Gris O, Guell JL, del Campo Z. Limbal-conjunctival autograft transplantation for the treatment of recurrent pterygium. *Ophthalmology*. 107. United States 2000. p. 270-3.
231. Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimmura S, Tsubota K. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 109. United States 2002. p. 1285-90.
232. Tsai RJ, Sun TT, Tseng SC. Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits. *Ophthalmology*. 1990;97(4):446-55.
233. Frucht-Pery J, Sigalos CS, Solomon A, Scheman L, Brautbar C, Zauberman H. Limbal cell autograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1998;236(8):582-7.
234. Dua HS, Azuara-Blanco A. Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol*. 2000;84(3):273-8.
235. Marinho D, Hofling-Lima AL, Kwitko S, Tseng SC. Does amniotic membrane transplantation improve the outcome of autologous limbal transplantation? *Cornea*. 2003;22(4):338-42.
236. Meallet MA, Espana EM, Grueterich M, Ti SE, Goto E, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation with conjunctival limbal autograft for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 2003;110(8):1585-92.
237. Daya SM, Chan CC, Holland EJ, Cornea Soc Ocular Surface P. Cornea Society Nomenclature for Ocular Surface Rehabilitative Procedures. *Cornea*. 2011;30(10):1115-9.
238. Miri A, Al-Deiri B, Dua HS. Long-term Outcomes of Autolimbal and Allolimbal Transplants. *Ophthalmology*. 2010;117(6):1207-13.
239. Dua HS. The conjunctiva in corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol*. 1998;82(12):1407-11.
240. Dua HS, Miri A, Said DG. Contemporary limbal stem cell transplantation - a review. *Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2010;38(2):104-17.
241. Reinhard T, Spelsberg H, Henke L, Kontopoulos T, Enczmann J, Wernet P, et al. Long-term results of allogeneic penetrating limbo-keratoplasty in total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 2004;111(4):775-82.
242. Böhringer D, Reinhard T, Duquesnoy RJ, Böhringer S, Enczmann J, Lange P, et al. Beneficial effect of matching at the HLA-A and -B amino-acid triplet level on rejection-free clear graft survival in penetrating keratoplasty. *Transplantation*. 2004;77(3):417-21.
243. Reinhard T, Böhringer D, Enczmann J, Kögler G, Mayweg S, Wernet P, et al. Improvement of graft prognosis in penetrating normal-risk keratoplasty by HLA class I and II matching. *Eye (Lond)*. 2004;18(3):269-77.
244. Tan DT, Ficker LA, Buckley RJ. Limbal transplantation. *Ophthalmology*. 1996;103(1):29-36.
245. Holland EJ, Djalilian AR, Schwartz GS. Management of aniridic keratopathy with keratolimbal allograft: a limbal stem cell transplantation technique. *Ophthalmology*. 110. United States 2003. p. 125-30.
246. Dua HS, Azuara-Blanco A. Allo-limbal transplantation in patients with limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol*. 1999;83(4):414-9.
247. Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(9):2506-13.

248. Daya SM, Ilari FA. Living related conjunctival limbal allograft for the treatment of stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 108. United States 2001. p. 126-33; discussion 33-4.
249. Kruse FE, Reinhard T. [Limbus transplantation for reconstruction of the ocular surface]. *Ophthalmologie*. 2001;98(9):818-31.
250. Maruyama-Hosoi F, Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K. Changes observed in keratolimbal allograft. *Cornea*. 25. United States 2006. p. 377-82.
251. Santos MS, Gomes JA, Hofling-Lima AL, Rizzo LV, Romano AC, Belfort R, Jr. Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol*. 140. United States 2005. p. 223-30.
252. Satake Y, Yamaguchi T, Hirayama M, Higa K, Shimazaki-Den S, Dogru M, et al. Ocular surface reconstruction by cultivated epithelial sheet transplantation. *Cornea*. 33 Suppl 11. United States 2014. p. S42-6.
253. Reinhard T, Spelsberg H, Henke L, Kontopoulos T, Enczmann J, Wernet P, et al. Long-term results of allogeneic penetrating limbo-keratoplasty in total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 111. United States 2004. p. 775-82.
254. Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol*. 1999;83(6):748-52.
255. Sloper CM, Powell RJ, Dua HS. Tacrolimus (FK506) in the management of high-risk corneal and limbal grafts. *Ophthalmology*. 2001;108(10):1838-44.
256. Shin YJ, Kim MK, Oh JY, Wee WR, Lee JH, Ko JH, et al. Short-term Efficacy of Topical Immunosuppressive Agents on the Survival of Cultivated Allo-Conjunctival Equivalents. *Korean J Ophthalmol*. 2008;22(2):123-9.
257. Shimazaki J, Konomi K, Shimmura S, Tsubota K. Ocular surface reconstruction for thermal burns caused by fireworks. *Cornea*. 25. United States 2006. p. 139-45.
258. Meller D, Pires RT, Mack RJ, Figueiredo F, Heiligenhaus A, Park WC, et al. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology*. 107. United States 2000. p. 980-9; discussion 90.
259. Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K. Limbal stem cell transplantation for the treatment of subepithelial amyloidosis of the cornea (gelatinous drop-like dystrophy). *Cornea*. 2002;21(2):177-80.
260. Solomon A, Ellies P, Anderson DF, Touhami A, Grueterich M, Espana EM, et al. Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 109. United States 2002. p. 1159-66.
261. Meller D, Pires RT, Tseng SC. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(4):463-71.
262. Ti SE, Anderson D, Touhami A, Kim C, Tseng SC. Factors affecting outcome following transplantation of ex vivo expanded limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(8):2584-92.
263. Du Y, Chen J, Funderburgh JL, Zhu X, Li L. Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membrane. *Mol Vis*. 2003;9:635-43.
264. Ramaesh K, Dhillon B. Ex vivo expansion of corneal limbal epithelial/stem cells for corneal surface reconstruction. *Eur J Ophthalmol*. 2003;13(6):515-24.
265. Sangwan VS, Vemuganti GK, Iftekhar G, Bansal AK, Rao GN. Use of autologous cultured limbal and conjunctival epithelium in a patient with severe bilateral ocular surface disease induced by acid injury: a case report of unique application. *Cornea*. 2003;22(5):478-81.
266. Ti SE, Grueterich M, Espana EM, Touhami A, Anderson DF, Tseng SC. Correlation of long term phenotypic and clinical outcomes following limbal epithelial transplantation cultivated on amniotic membrane in rabbits. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(3):422-7.

267. Sun TT, Lavker RM. Corneal epithelial stem cells: past, present, and future. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2004;9(3):202-7.
268. Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK, Ifthekar G, Fatima A, Singh S, et al. Early results of penetrating keratoplasty after cultivated limbal epithelium transplantation. *Arch Ophthalmol.* 123. United States2005. p. 334-40.
269. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet.* 1997;349(9057):990-3.
270. Samson CM, Nduaguba C, Baltatzis S, Foster CS. Limbal stem cell transplantation in chronic inflammatory eye disease. *Ophthalmology.* 2002;109(5):862-8.
271. Grueterich M, Espana E, Tseng SC. Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(1):63-71.
272. Hernandez Galindo EE, Theiss C, Steuhl KP, Meller D. Expression of Delta Np63 in response to phorbol ester in human limbal epithelial cells expanded on intact human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(7):2959-65.
273. Tseng SC, Meller D, Anderson DF, Touhami A, Pires RT, Grueterich M, et al. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane for treating corneal diseases with total limbal stem cell deficiency. *Adv Exp Med Biol.* 2002;506(Pt B): 1323-34.
274. Nakamura T, Endo K, Cooper LJ, Fullwood NJ, Tanifuji N, Tsuzuki M, et al. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(1):106-16.
275. Tseng SC. Move stem cells from the mouth to the eye. *Am J Ophthalmol.* 141. United States2006. p. 356-7.
276. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S. Current concepts and challenges in ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial transplantation. *Cornea.* 24. United States2005. p. S32-S8.
277. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med.* 351. United States: 2004 Massachusetts Medical Society; 2004. p. 1187-96.
278. Hirayama M, Satake Y, Higa K, Yamaguchi T, Shimazaki J. Transplantation of cultivated oral mucosal epithelium prepared in fibrin-coated culture dishes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 53. United States2012. p. 1602-9.
279. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S. Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol.* 141. United States2006. p. 267-75.
280. Nakamura T, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. *Cornea.* 2003;22(7 Suppl):S75-80.
281. Hayashida Y, Nishida K, Yamato M, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, et al. Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46. United States2005. p. 1632-9.
282. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 88. England2004. p. 1280-4.

283. Nakamura T, Takeda K, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S. Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 95. England2011. p. 942-6.
284. Sotozono C, Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Yokoi N, Ueta M, et al. Visual Improvement after Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation. *Ophthalmology.* 2013;120(1):193-200.
285. Tanioka H, Kawasaki S, Yamasaki K, Ang LP, Koizumi N, Nakamura T, et al. Establishment of a cultivated human conjunctival epithelium as an alternative tissue source for autologous corneal epithelial transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47. United States2006. p. 3820-7.
286. Oh JY, Roddy GW, Choi H, Lee RH, Yloetalo JH, Rosa RH, Jr., et al. Anti-inflammatory protein TSG-6 reduces inflammatory damage to the cornea following chemical and mechanical injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(39):16875-80.
287. Silber PC, Ricardo JR, Cristovam PC, Hazarbassanov RM, Dreyfuss JL, Gomes JA. Conjunctival epithelial cells cultivated ex vivo from patients with total limbal stem cell deficiency. *Eur J Ophthalmol.* 2014;0.
288. Mathews S, Chidambaram JD, Lanjewar S, Mascarenhas J, Prajna NV, Muthukkaruppan V, et al. In vivo confocal microscopic analysis of normal human anterior limbal stroma. *Cornea.* 2015;34(4):464-70.
289. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *The Journal of clinical investigation.* 2005;115(3):572-83.
290. Yao L, Bai H. Review: mesenchymal stem cells and corneal reconstruction. *Mol Vis.* 2013;19:2237-43.
291. Roddy GW, Oh JY, Lee RH, Bartosh TJ, Ylostalo J, Coble K, et al. Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF-alpha stimulated gene/protein 6. *Stem Cells.* 2011;29(10):1572-9.
292. Oh JY, Ko JH, Kim MK, Wee WR. Effects of Mesenchymal Stem/Stromal Cells on Cultures of Corneal Epithelial Progenitor Cells With Ethanol InjuryMSC Effects on Cultures of Chemically Injured hCEP. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2014;55(11):7628-35.
293. Acar U, Pinarli FA, Acar DE, Beyazyildiz E, Sobaci G, Ozgermen BB, et al. Effect of allogeneic limbal mesenchymal stem cell therapy in corneal healing: role of administration route. *Ophthalmic Res.* 2015;53(2):82-9.
294. Alio del Barrio JL, Chiesa M, Garagorri N, Garcia-Urquia N, Fernandez-Delgado J, Bataille L, et al. Acellular human corneal matrix sheets seeded with human adipose-derived mesenchymal stem cells integrate functionally in an experimental animal model. *Exp Eye Res.* 2015;132:91-100.
295. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study design and baseline patient characteristics. ETDRS report number 7. *Ophthalmology.* 1991;98(5 Suppl):741-56.
296. Arditi A, Cagenello R. On the statistical reliability of letter-chart visual acuity measurements. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34(1):120-9.
297. Told R, Baratsits M, Garhofer G, Schmetterer L. [Early treatment diabetic retinopathy study (ETDRS) visual acuity]. *Ophthalmologie.* 2013;110(10):960-5.
298. Bailey IL, Lovie JE. New design principles for visual acuity letter charts. *American journal of optometry and physiological optics.* 1976;53(11):740-5.
299. Perkins ES. Hand-held applanation tonometer. *Br J Ophthalmol.* 1965;49(11):591-3.
300. Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea.* 2003;22(7):640-50.



301. Abelson MB, Ousler GW, 3rd, Nally LA, Welch D, Krenzer K. Alternative reference values for tear film break up time in normal and dry eye populations. *Adv Exp Med Biol.* 2002;506(Pt B): 1121-5.
302. Mangione CM, Lee PP, Pitts J, Gutierrez P, Berry S, Hays RD. Psychometric properties of the National Eye Institute Visual Function Questionnaire (NEI-VFQ). NEI-VFQ Field Test Investigators. *Arch Ophthalmol.* 1998;116(11):1496-504.
303. Mangione CM, Lee PP, Gutierrez PR, Spritzer K, Berry S, Hays RD. Development of the 25-item National Eye Institute Visual Function Questionnaire. *Arch Ophthalmol.* 2001;119(7): 1050-8.
304. van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol.* 1969;82(1): 10-4.
305. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Annals of the rheumatic diseases.* 2002;61(6):554-8.
306. Farris RL, Stuchell RN, Mandel ID. Basal and reflex human tear analysis. I. Physical measurements: osmolality, basal volumes, and reflex flow rate. *Ophthalmology.* 1981;88(8):852-7.
307. Rio-Cristobal A, Martin R, Belin MW, Ambrosio R, Pinero DP, Nieto Jc Fau - Lopez-Miguel A, et al. Corneal assessment technologies: current status Scheimpflug imaging for keratoconus and ectatic disease Characterization of corneal structure in keratoconus Quality of vision in eyes after selective lamellar keratoplasty Anterior segment biometry: a study and review of resolution and repeatability data Corneal imaging with slit-scanning and Scheimpflug imaging techniques. (1879-3304 (Electronic)).
308. Al-Sayyari TM, Fawzy SM, Al-Saleh AA, Al-Sayyari TM, Fawzy SM, Al-Saleh AA, et al. Corneal spherical aberration and its impact on choosing an intraocular lens for cataract surgery Corneal spherical aberration in Saudi population Analysis of age-dependence of the anterior and posterior cornea with scheimpflug imaging Analysis of corneal spherical aberration in patients before and after phacoemulsification Higher-order aberrations after corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia Corneal higher-order aberrations after Descemet's membrane endothelial keratoplasty Corneal imaging with slit-scanning and Scheimpflug imaging techniques Corneal thickness association with ocular and corneal high-order aberrations Corneal topography with Scheimpflug imaging and videokeratography: comparative study of normal eyes. (1319-4534 (Print)).
309. Nelson JD, Wright JC. Tear film osmolality determination: an evaluation of potential errors in measurement. *Curr Eye Res.* 1986;5(9):677-81.
310. Farris RL. Tear osmolality--a new gold standard? *Adv Exp Med Biol.* 1994;350:495-503.
311. Farris RL, Stuchell RN, Mandel ID. Tear osmolality variation in the dry eye. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1986;84:250-68.
312. Berchicci L, Iuliano L, Miserocchi E, Bandello F, Modorati G. Tear osmolality in ocular graft-versus-host disease. *Cornea.* 2014;33(12):1252-6.
313. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.
314. Rasband W. Image J. In: U. S. National Institutes of Health B, Maryland, USA, editor. Bethesda, Maryland, USA 1997-2014.
315. Meijering E, Jacob M, Sarria JC, Steiner P, Hirling H, Unser M. Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology.* 2004;58(2):167-76.
316. Meijering E. Neuron tracing in perspective. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology.* 2010;77(7):693-704.

317. David Díaz Valle JMBdC. Enfermedad Injerto contra Huésped. In: José M. Benítez del Castillo Sánchez JADdlC, María Teresa Rodríguez Ares, editor. Superficie Ocular. LXXX Ponencia Oficial de la Sociedad Española de Oftalmología2004. p. 264-8.
318. José M. Benítez del Castillo Sánchez OGC. Epiteliectomía Conjuntival Sectorial Secuencial. In: José M. Benítez del Castillo Sánchez JADdlC, María Teresa Rodríguez Ares, editor. Superficie Ocular. LXXX Ponencia Oficial de la Sociedad Española de Oftalmología2004. p. 397-400.
319. Beuerman RW, Schimmelpfennig B. Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Experimental neurology*. 1980;69(1):196-201.
320. Araki K, Ohashi Y, Kinoshita S, Hayashi K, Kuwayama Y, Tano Y. Epithelial wound healing in the denervated cornea. *Curr Eye Res*. 1994;13(3):203-11.
321. Donate J, Benitez del Castillo JM, Fernandez C, Garcia Sanchez J. [Validation of a questionnaire for the diagnosis of dry eye]. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2002;77(9):493-500.
322. Rodriguez-Torres LA, Porras-Machado DJ, Villegas-Guzman AE, Molina-Zambrano JA. [Analysis of incidence of ocular surface disease index with objective tests and treatment for dry eye]. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2010;85(2):70-5.
323. Research in dry eye: report of the Research Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf*. 2007;5(2):179-93.
324. Clayton JA, Eydelman M, Vitale S, Manukyan Z, Kramm R, Datiles M, 3rd, et al. Web-based versus paper administration of common ophthalmic questionnaires: comparison of subscale scores. *Ophthalmology*. 2013;120(10):2151-9.
325. Cebreiro E, Ramos L, Mosquera A, Barreira N, Penedo MFG, editors. Automation of the tear film break-up time test. *ACM International Conference Proceeding Series*; 2011.
326. Cho P, Douthwaite W. The Relation between Invasive and Noninvasive Tear Break-Up Time. *Optometry & Vision Science*. 1995;72(1):17-22.
327. Nichols JJ, Nichols KK, Puent B, Saracino M, Mitchell GL. Evaluation of Tear Film Interference Patterns and Measures of Tear Break-Up Time. *Optometry & Vision Science*. 2002;79(6):363-9.
328. Madden RK, Paugh JR, Wang C. Comparative study of two non-invasive tear film stability techniques. *Curr Eye Res*. 1994;13(4):263-9.
329. Pult H, Riede-Pult B. The new "TF-Scan" application for video keratography: its repeatability and usefulness in tear film break-up time analysis. *Contact Lens and Anterior Eye*. 34:S14.
330. Mengher LS, Pandher KS, Bron AJ. Non-invasive tear film break-up time: sensitivity and specificity. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1986;64(4):441-4.
331. Mathers WD, Lane JA. Meibomian gland lipids, evaporation, and tear film stability. *Adv Exp Med Biol*. 1998;438:349-60.
332. Baek J, Doh SH, Chung SK. Comparison of Tear Meniscus Height Measurements Obtained With the Keratograph and Fourier Domain Optical Coherence Tomography in Dry Eye. *Cornea*. 2015;34(10):1209-13.
333. Vitali C, Moutsopoulos HM, Bombardieri S. The European Community Study Group on diagnostic criteria for Sjogren's syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjogren's syndrome. *Annals of the rheumatic diseases*. 1994;53(10):637-47.
334. Mackie IA, Seal DV. The questionably dry eye. *Br J Ophthalmol*. 1981;65(1):2-9.
335. Pflugfelder SC, Tseng SC, Yoshino K, Monroy D, Felix C, Reis BL. Correlation of goblet cell density and mucosal epithelial membrane mucin expression with rose bengal staining in patients with ocular irritation. *Ophthalmology*. 1997;104(2):223-35.

336. Ibrahim OM, Dogru M, Takano Y, Satake Y, Wakamatsu TH, Fukagawa K, et al. Application of visante optical coherence tomography tear meniscus height measurement in the diagnosis of dry eye disease. *Ophthalmology*. 2010;117(10):1923-9.
337. Qiu X, Gong L, Sun X, Jin H. Age-related variations of human tear meniscus and diagnosis of dry eye with Fourier-domain anterior segment optical coherence tomography. *Cornea*. 2011;30(5):543-9.
338. Qiu X, Gong L, Lu Y, Jin H, Robitaille M. The diagnostic significance of Fourier-domain optical coherence tomography in Sjogren syndrome, aqueous tear deficiency and lipid tear deficiency patients. *Acta Ophthalmol*. 2012;90(5):e359-66.
339. Fellman RL, Sullivan EK, Ratliff M, Silver LH, Whitson JT, Turner FD, et al. Comparison of travoprost 0.0015% and 0.004% with timolol 0.5% in patients with elevated intraocular pressure: a 6-month, masked, multicenter trial. *Ophthalmology*. 2002;109(5):998-1008.
340. Alagoz G, Bayer A, Boran C, Serin D, Kukner A, Elcioglu M. Comparison of ocular surface side effects of topical travoprost and bimatoprost. *Ophthalmologica*. 2008;222(3):161-7.
341. JL U, al. e. Efectos adversos de la medicación hipotensora antiglaucomatosa. In: García-Sánchez J, al. e, editors. *Diagnóstico y tratamiento del glaucoma de ángulo abierto* 2013.
342. Li DQ, Luo L, Chen Z, Kim HS, Song XJ, Pflugfelder SC. JNK and ERK MAP kinases mediate induction of IL-1beta, TNF-alpha and IL-8 following hyperosmolar stress in human limbal epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2006;82(4):588-96.
343. Gilbard JP, Carter JB, Sang DN, Refojo MF, Hanninen LA, Kenyon KR. Morphologic effect of hyperosmolarity on rabbit corneal epithelium. *Ophthalmology*. 1984;91(10):1205-12.

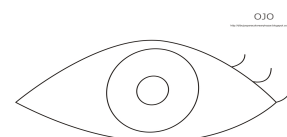
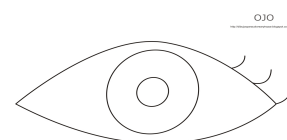
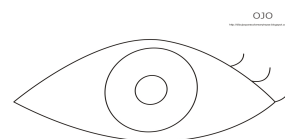


# XI. ANEXOS

## XI. ANEXO 1. CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

(Rodear con un círculo la respuesta adecuada. Dibujar la imagen del ojo)

1. OD ☐ OI ☐
2. ETIOLOGÍA \_\_\_\_\_
3. Episodios úlceras corneales o erosiones corneales recurr. (dolor fuerte ocular) en los últ. 6 m: \_\_\_\_\_
4. Fotofobia: NO Leve Moderada Grave
5. Epífora: NO Leve Moderada Grave
6. Agudeza visual ETDRS Chart 1 a 4m: \_\_\_\_\_ (nº letras) (si no es el de 4 ponerlo)
7. PENTACAM: SI NO NO SALE
8. Pannus (fotografiar el ojo y dibujarlo aquí): dibujo 1
  - 8.1. No pannus: ☐
  - 8.2. Afectación corneal desde limbo: \_\_\_\_\_ mm
  - 8.3. Cuadrantes horarios afectados: \_\_\_\_\_ (0-12, total)
  - 8.4. Si es menos de 1 mm: ☐ si es más de 1 mm (en el punto 10.4 solo se puede poner uno, son excluyentes):
    - 8.4.1. < 180 grados ☐ > 180 grados corneales afectados ☐
  - 8.5. Afectación cornea central ☐ (en caso afirmativo)
9. Brillo corneal apagado: ☐ (en caso afirmativo)
10. Tinción con fluoresceína, NO CON FLUOTEST (foto y dibujar): dibujo2
  - 10.1. QPS: ☐
  - 10.2. Patrón de vórtex en epitelio corneal: ☐
  - 10.3. Tinción tardía y persistente: ☐
  - 10.4. Inestabilidad lagrimal: ☐
  - 10.5. Defecto epitelial: ☐
11. BUT: \_\_\_\_\_ segundos
12. Escala de Oxford con fluoresceína (pintar)
13. Test VFQ25 y apéndice (para lavar fluo)
14. Tinción con verde de lisamina: foto y dibujar. Dibujo 3.
15. Test Van Bijsterveld (verde de lisamina): \_\_\_\_\_
16. Test OSDI: \_\_\_\_\_
17. Test de Schirmer I: \_\_\_\_\_ mm
18. Presión intraocular (Perkins) \_\_\_\_\_ mmHg (fluotest, ahora si)
19. Osmolaridad lagrimal: \_\_\_\_\_
20. Hallazgos Oculus Keratograph:
21. Hallazgos Microscopia confocal, CENTRAL IZQ DCHA ABAJO ARRIBA
  - 21.1. Células:
  - 21.2. Nervios:
22. Otras observaciones: \_\_\_\_\_



# **XI. ANEXO 2. AV ETDRS OD**

## **VISUAL ACUITY – RESULTS**

*Reminder: Visual acuity examiners should be masked to treatment assignments.*

*In case of errors: Draw a single line through error, insert correction and sign with date and initials/name.*

Participant ID: _____	Visit N <sup>o</sup> : _____	Visit Date: _____
Manifest Refraction – RIGHT eye: (Circle + or – below). Fields with no value: enter 0		
OD + – _____ (sphere)	+ – _____ (cylinder)	x _____ (axis)

### **Visual Acuity – RIGHT Eye – Chart 1**

- Circle each letter the participant identified correctly at 4 meters.
- For each row, write the total number of letters read correctly in the column to the right.  
If line is attempted but no letters are read correctly, please enter a zero (0).  
If line is not attempted, please enter a dash (–).
- To score, enter the sum of the row totals of correct letters at the specified distance.
- If the total number of letters correct at 4 meters is <20, perform the 1 meter test.
- If the total number of letters correct at 4 meters is ≥20, add 30 points.

Add +0.75 sphere to 4-meter refraction if tested at 1 meter

☐ N/A; ✓ if 1 meter test was not necessary

Row	Snellen Acuity Equivalent	Chart 1 - Letters	Number Correct at 4 meters
1	20/200	N C K Z O	
2	20/160	R H S D K	
3	20/125	D O V H R	
4	20/100	C Z R H S	
5	20/80	O N H R C	
6	20/63	D K S N V	
7	20/50	Z S O K N	
8	20/40	C K D N R	
9	20/32	S R Z K D	
10	20/25	H Z O V C	
11	20/20	N V D O K	
12	20/16	V H C N O	
13	20/12.5	S V H C Z	
14	20/10	O Z D V K	
Sum of Row Totals:			

Row	Snellen Acuity Equivalent	Chart 1 - Letters	Number Correct at 1 meter
1	20/800	N C K Z O	
2	20/640	R H S D K	
3	20/500	D O V H R	
4	20/400	C Z R H S	
5	20/320	O N H R C	
6	20/250	D K S N V	
Sum of Row Totals:			

If zero letters are read correctly at 1 meter, indicate best visual acuity for RIGHT eye:

- ☐ Count Fingers  
☐ Hand Motion  
☐ Light Perception  
☐ No Light Perception
- } @ \_\_\_\_\_ (distance)

<b>Visual Acuity Score – RIGHT eye:</b>	
A. Total number correct at 4 meters:	_____
B. If A ≥ 20, enter 30, otherwise enter a zero (0):	_____
C. Total number correct at 1 meter (if not tested, enter a zero):	_____
RIGHT EYE: Sum of A, B and C above:	_____
Approximate SNELLEN acuity equivalent (smallest line with 1 or fewer errors):	_____

## XI. ANEXO 3. AV ETDRS OI

### VISUAL ACUITY – RESULTS

*Reminder:* Visual acuity examiners should be masked to treatment assignments.  
In case of errors: Draw a single line through error, insert correction and sign with date, and initials/name.

Participant ID: _____	Visit N°: _____	Visit Date: _____
Manifest Refraction – LEFT eye: (Circle + or – below).		Fields with no value: enter 0
OS + – _____ (sphere)	+ – _____ (cylinder)	x _____ (axis)

#### Visual Acuity – LEFT Eye – Chart 2

- Instructions are the same as for Visual Acuity measurement in the right eye.
- Occlude the right eye before inserting ETDRS Chart 2 into the light box.

Add +0.75 sphere to 4-meter refraction if tested at 1 meter

☐ N/A; ☐ if 1 meter test was not necessary

Row	Snellen Acuity Equivalent	Chart 2 - Letters	Number Correct at 4 meters
1	20/200	D S R K N	
2	20/160	C K Z O H	
3	20/125	O N R K D	
4	20/100	K Z V D C	
5	20/80	V S H Z O	
6	20/63	H D K C R	
7	20/50	C S R H N	
8	20/40	S V Z D K	
9	20/32	N C V O Z	
10	20/25	R H S D V	
11	20/20	S N R O H	
12	20/16	O D H K R	
13	20/12.5	Z K C S N	
14	20/10	C R H D V	
Sum of Row Totals:			

Row	Snellen Acuity Equivalent	Chart 2 - Letters	Number Correct at 1 meter
1	20/800	D S R K N	
2	20/640	C K Z O H	
3	20/500	O N R K D	
4	20/400	K Z V D C	
5	20/320	V S H Z O	
6	20/250	H D K C R	
Sum of Row Totals:			

If zero letters are read correctly at 1 meter, indicate best visual acuity for LEFT eye:

- ☐ Count Fingers } @ \_\_\_\_\_ (distance)  
☐ Hand Motion  
☐ Light Perception  
☐ No Light Perception

<b>Visual Acuity Score – LEFT eye:</b>	
A. Total number correct at 4 meters:	_____
B. If A ≥ 20, enter 30, otherwise enter a zero (0):	_____
C. Total number correct at 1 meter (if not tested, enter a zero):	_____
LEFT EYE: Sum of A, B and C above: _____	
Approximate SNELLEN acuity equivalent (smallest line with 1 or fewer errors): _____	
<input type="checkbox"/> I confirm that a certified lane was used for the BCVA assessment.	
VA Examiner's Name: _____	Date: _____

## XI. ANEXO 4. OSDI

Fecha:        /        /

Nº paciente: \_\_\_\_\_

Nº: observador: \_\_\_\_\_

Ha experimentado en la última semana:	Todo el día	La mayor parte del día	La mitad del día	En algunos momentos del día	Nunca
Sensibilidad a la luz?					
Sensación de arenilla en sus ojos?					
Dolor o ardor?					
Visión borrosa?					
Mala visión?					

Se ha visto limitada en la última semana en las siguientes actividades por molestias en sus ojos?	Todo el día	La mayor parte del día	La mitad del día	En algunos momentos del día	Nunca	No realice esta actividad (X)
Lectura						
Manejar de noche						
Uso de la computadora						
Mirar televisión						

Ha sentido sus ojos molestos durante la última semana en las siguientes situaciones?	Todo el día	La mayor parte del día	La mitad del día	En algunos momentos del día	Nunca	No estuve expuesto (X)
Clima ventoso						
Ambientes secos						
Habitaciones con aire acondicionado						

Puntuación

4

3

2

1

0

NC

☐
☐
☐
☐
☐
☐

Puntuación total: \_\_\_\_\_

$$\text{OSDI} = \frac{(\text{Punt. total}) \times 25}{(\text{N}^\circ \text{ de preguntas contestadas})}$$



## **XI. ANEXO 5. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE**

MODELO DE HOJA DE INFORMACIÓN PARA LOS PACIENTES INCLUIDOS EN UN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

### **TÍTULO DEL ESTUDIO**

CORRELACIÓN DE CRITERIOS DIAGNÓSTICOS Y ESCALA DE SEVERIDAD EN LA INSUFICIENCIA LIMBAR ASISTIDA CON MICROSCOPIA CONFOCAL

### **INVESTIGADORES**

DR.MANUEL CARO MAGDALENO

DR.JESÚS MONTERO DE IRUZUBIETA

Este estudio se está realizando en el Hospital Universitario Virgen Macarena y Rocío de Sevilla, y ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de centro (CEI).

La participación en el estudio es completamente **voluntaria**. Vd. puede decidir no participar, o si decide participar, puede retirar su consentimiento en cualquier momento sin necesidad de dar ninguna explicación. Puede estar seguro de que su decisión de participar o no en el mismo no va a afectar a la relación con su médico ni a la asistencia médica que va a recibir.

### **¿Cuál es el propósito del estudio?**

*El Síndrome de Insuficiencia Limbar(SIL) es producida por múltiples causas y produce desde una debilidad del epitelio corneal causando úlceras corneales recidivantes, hasta opacificación de la cornea. Existen criterios diagnósticos subjetivos y distintas escalas de severidad también basado en hechos subjetivos. Estas escalas son importantes porque según ellas se aplican una gradación terapéutica. Existen determinadas pruebas diagnosticas, incruentas que podrían definir mejor y de forma objetiva el diagnóstico de IL y su estadiaje. Pretendemos con esta recogida de datos mejorar el conocimiento de esta enfermedad para proponer luego nuevos estudios encaminados a mejorar el pronóstico y la calidad visual de nuestros pacientes.*

### **¿Por qué me ofrecen participar a mí?**

Porque está usted diagnosticado de SIL.

### **¿En qué consiste mi participación?**

En realizarle una serie de preguntas, cuestionarios y pruebas totalmente incruentas y no invasivas.

### **¿Qué riesgos tiene este estudio?**

Sólo una posible alergia a tinciones vitales que ya seguramente su médico oftalmólogo le habrá instilado alguna vez para la exploración y que son sumamente extrañas.

### **¿Recibiré información sobre los resultados del estudio?**

Si usted lo quisiera si. Por favor dejenos un email donde enviárselo.

**PARTE 1 – SALUD GENERAL Y VISIÓN**

1. En general, usted diría que su salud global es:

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Excelente.....1
- Muy buena.....2
- Buena.....3
- Regular.....4
- Mala.....5

2. Actualmente, usted diría que su vista usando ambos ojos (usando gafas o lentes de contacto, si es que usted las usa) es:

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Excelente.....1
- Buena.....2
- Regular.....3
- Mala.....4
- Muy Mala.....5
- Ceguera completa.....6

3. ¿Cuanto tiempo está usted preocupado por su visión?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Nunca.....1
- Una pequeña parte del tiempo.....2
- De vez en cuando.....3
- La mayor parte del tiempo.....4
- Siempre.....5

4. ¿Cuanto dolor o malestar ha sentido en los ojos o alrededor de ellos? Por ejemplo, ardor, picazón, irritación, inflamación, molestia o dolor.

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Ninguno.....1
- Un poco.....2
- Moderado.....3
- Mucho, grave.....4
- Muy severo o grave.....5

## PARTE 2 - DIFICULTAD REALIZANDO ACTIVIDADES

Las siguientes preguntas son acerca de la dificultad que usted pueda tener para hacer determinadas actividades. Si usa gafas o lentes de contacto, por favor responda a las preguntas como si los llevara puestas.

3. Con respecto al grado de dificultad tiene para leer la letra normal de periódico, usted diría que:

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Ninguna dificultad.....1  
 Un poco de dificultad.....2  
 Moderada dificultad.....3  
 Extrema dificultad.....4  
 Dejó de hacerlo a causa de su vista.....5  
 Dejó de hacerlo por otras razones o porque no está interesado en hacerlo.....6

6. ¿Qué grado de dificultad tiene para realizar trabajos o actividades lúdicas que exigen que vea bien de cerca, como cocinar, coser, arreglar cosas en la casa, o usar herramientas?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Ninguna dificultad.....1  
 Un poco de dificultad.....2  
 Moderada dificultad.....3  
 Extrema dificultad.....4  
 Dejó de hacerlo a causa de su vista.....5  
 Dejó de hacerlo por otras razones o porque no está interesado en hacer esto.....6

7. A causa de su vista, ¿qué grado de dificultad tiene usted para encontrar algo en un estantería llena de cosas?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Ninguna dificultad.....1  
 Un poco de dificultad.....2  
 Moderada dificultad.....3  
 Extrema dificultad.....4  
 Dejó de hacerlo a causa de su vista.....5  
 Dejó de hacerlo por otras razones o porque no está interesado en hacer esto.....6

**¿Se publicarán los resultados del estudio?**

**Se intentará publicar en revistas científicas o mediante tesis.**

**¿Cómo se protegerá la confidencialidad de mis datos?**

El tratamiento de sus datos se hará con arreglo a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de datos de carácter personal.

Sólo el equipo investigador tendrá acceso a sus datos personales.

**¿Existen intereses económicos en este estudio?**

Ninguno

**¿Quién me puede dar más información?**

Puede contactar con el equipo investigador en Oftalmología del Hospital Universitario Virgen Macarena, teléfono                      o del H.U.V.Rocío: 955013119/20.

Muchas gracias por su colaboración.

12. A causa de su vista, ¿qué grado de dificultad tiene para escoger y combinar su propia ropa?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Ninguna dificultad.....1  
 Un poco de dificultad.....2  
 Moderada dificultad.....3  
 Extrema dificultad.....4  
 Dejó de hacerlo a causa de su vista.....5  
 Dejó de hacerlo por otras razones o porque no está interesado en hacer esto.....6

13. A causa de su vista, ¿qué grado de dificultad tiene para salir, ir a casa de la gente, a fiestas o a restaurantes?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Ninguna dificultad.....1  
 Un poco de dificultad.....2  
 Moderada dificultad.....3  
 Extrema dificultad.....4  
 Dejó de hacerlo a causa de su vista.....5  
 Dejó de hacerlo por otras razones o porque no está interesado en hacer esto.....6

14. A causa de su vista, ¿qué grado de dificultad tiene para ver películas en el cine, obras de teatro, o eventos deportivos?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Ninguna dificultad.....1  
 Un poco de dificultad.....2  
 Moderada dificultad.....3  
 Extrema dificultad.....4  
 Dejó de hacerlo a causa de su vista.....5  
 Dejó de hacerlo por otras razones o porque no está interesado en hacer esto.....6

15. Ahora me gustaría hablarle sobre la conducción de un vehículo. ¿Conduce un vehículo en la actualidad, al menos de vez en cuando?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- SI.....1 → Saltar a la pregunta 15c  
 NO.....2 → Seguir con la siguiente pregunta, 15a

15 a.- En caso de NO CONDUCIR, ¿es porque nunca ha conducido un coche o porque ha dejado de hacerlo?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Nunca conduje.....1 → Ir a la pregunta 17  
 He dejado de hacerlo.....2 → Ir a pregunta 15b

15 b. Si HA DEJADO DE CONDUCIR, ¿dejó de conducir principalmente a causa de su vista, principalmente por otras razones, o por su vista y otras razones?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

Principalmente la vista.....1      Ir a la pregunta 17  
 Principalmente otras razones.....2      → Ir a la pregunta 17  
 Tanto por la vista como por otras razones.....3      Ir a la pregunta 17

15c. Si CONDUCE EN LA ACTUALIDAD, ¿qué dificultad tiene para conducir durante el día por lugares conocidos?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

Ninguna dificultad.....1  
 Un poco de dificultad.....2  
 Moderada dificultad.....3  
 Extrema dificultad.....4

16. Si CONDUCE EN LA ACTUALIDAD, ¿qué dificultad tiene para conducir de noche?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

Ninguna dificultad.....1  
 Un poco de dificultad.....2  
 Moderada dificultad.....3  
 Extrema dificultad.....4  
 Dejó de hacerlo a causa de su vista.....5  
 Dejó de hacerlo por otras razones o porque no está interesado en hacer esto.....6

16a. ¿Cuánta dificultad tiene usted la conducción en condiciones difíciles, tales como en el mal tiempo, durante las horas pico, en la autopista o en el tráfico de la ciudad?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

Ninguna dificultad.....1  
 Un poco de dificultad.....2  
 Moderada dificultad.....3  
 Extrema dificultad.....4  
 Dejó de hacerlo a causa de su vista.....5  
 Dejó de hacerlo por otras razones o porque no está interesado en hacer esto.....6

**PARTE 3: RESPUESTAS A PROBLEMAS DE LA VISTA**

Las siguientes preguntas son acerca de cosas que podrían sucederle a usted a causa de visión. Para cada pregunta, debe señalar si esto es cierto para usted siempre, la mayor parte del tiempo, parte del tiempo, una pequeña parte del tiempo, o nunca.

17. ¿Con qué frecuencia logra usted hacer menos cosas de lo que hubiese gustado a causa de su vista?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Todo el tiempo.....1  
 La mayor parte del tiempo.....2  
 Parte del tiempo.....3  
 Una pequeña parte del tiempo.....4  
 Nunca.....5

18. ¿Ha tenido que limitar la cantidad de tiempo que usted le dedica a trabajar o otras actividades por su vista?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Todo el tiempo.....1  
 La mayor parte del tiempo.....2  
 Parte del tiempo.....3  
 Una pequeña parte del tiempo.....4  
 Nunca.....5

19. ¿Qué parte del tiempo usted no puede hacer lo que quisiera a causa del dolor o malestar en los ojos o alrededor de los ojos, como por ejemplo ardor, picazón, irritación, inflamación, molestia o dolor?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Todo el tiempo.....1  
 La mayor parte del tiempo.....2  
 Parte del tiempo.....3  
 Una pequeña parte del tiempo.....4  
 Nunca.....5

En las siguientes preguntas, diga si la frase es definitivamente cierta, mayormente cierta, mayormente falsa, definitivamente falsa o no está seguro/a.

20. Me quedo en casa la mayor parte del tiempo a causa de mi vista. Diría usted que es:

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Definitivamente cierto.....1  
 Mayormente cierto.....2  
 No está seguro/a.....3  
 Mayormente falso.....4  
 Definitivamente falso.....5

# **XI. ANEXO 6. APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE ÉTICA INTERHOSPITALARIO.**

**JUNTA DE ANDALUCÍA**

**CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES**  
Dirección General de Calidad, Investigación, Desarrollo e Innovación  
Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía

## **DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA**

D/D<sup>a</sup>: Jose Salas Turrents como secretario/a del **CEI de los hospitales universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío**

### **CERTIFICA**

Que este Comité refrendará de oficio en la reunión celebrada en el día 30/01/2015 la propuesta de (No hay promotor/a asociado/a) para realizar el estudio de investigación titulado:

Título del estudio:	CORRELACIÓN DE CRITERIOS DIAGNÓSTICOS Y ESCALA DE SEVERIDAD EN LA INSUFICIENCIA LIMBAR ASISTIDA CON MICROSCOPIA CONFOCAL „( Estadiaje insuficiencia limbar )
Protocolo, Versión:	versión 1
HIP, Versión:	versión 1
CI, Versión:	versión 1

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.

La capacidad del/de la investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.

Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Y que este Comité considera, que dicho estudio puede ser realizado en los Centros de la Comunidad Autónoma de Andalucía que se relacionan, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro correspondiente determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.



Lo que firmo en a 13/02/2015

D/D<sup>a</sup>. Jose Salas Turrents , como Secretario/a del CEI de los hospitales universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío



## **XI. ANEXO 7. VFQ 25 CASTELLANO**

# **CUESTIONARIO SOBRE FUNCIÓN VISUAL NEI-VFQ25<sub>(VERSIÓN 2000)</sub>**

(APÉNDICE ADJUNTO PARA NEI-VFQ39 pág. 9-12)

**NOMBRE DEL PACIENTE:**

---

**NOMBRE DEL ENTREVISTADOR:**

---

**FECHA:**

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

En primer lugar , me gustaría agradecerle su ayuda en este estudio.

Este cuestionario evalúa problemas relacionados con su vista o sentimientos que usted tiene acerca de la condición de su vista.

Lea las preguntas de este cuestionario y escoja para cada pregunta la respuesta que mejor describa su situación, rodeándola el número de la respuesta con un círculo.

Si usted lleva gafas o lentes de contacto habitualmente o para alguna actividad concreta, responda todas las preguntas como si las llevara puestas, con uno o los dos ojos abiertos, **como vea mejor**.

Es importante que realice el cuestionario sin prisas y con respuestas sinceras, para que el resultado sea representativo. Todas sus respuestas son confidenciales

8. A causa de su vista, ¿qué grado de dificultad tiene para leer los nombres de las calles o los rótulos de las tiendas?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Ninguna dificultad.....1  
 Un poco de dificultad.....2  
 Moderada dificultad.....3  
 Extrema dificultad.....4  
 Dejó de hacerlo a causa de su vista.....5  
 Dejó de hacerlo por otras razones o porque no está interesado en hacer esto.....6

9. A causa de su vista, ¿qué grado de dificultad tiene para bajar escalones, escaleras, o el borde de la acera cuando hay poca luz o es de noche?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Ninguna dificultad.....1  
 Un poco de dificultad.....2  
 Moderada dificultad.....3  
 Extrema dificultad.....4  
 Dejó de hacerlo a causa de su vista.....5  
 Dejó de hacerlo por otras razones o porque no está interesado en hacer esto.....6

10. A causa de su vista, ¿qué grado de dificultad tiene para ver objetos que están a los lados mientras camina?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Ninguna dificultad.....1  
 Un poco de dificultad.....2  
 Moderada dificultad.....3  
 Extrema dificultad.....4  
 Dejó de hacerlo a causa de su vista.....5  
 Dejó de hacerlo por otras razones o porque no está interesado en hacer esto.....6

11. A causa de su vista, ¿qué grado de dificultad tiene para ver cómo reacciona la gente a lo que usted dice?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Ninguna dificultad.....1  
 Un poco de dificultad.....2  
 Moderada dificultad.....3  
 Extrema dificultad.....4  
 Dejó de hacerlo a causa de su vista.....5  
 Dejó de hacerlo por otras razones o porque no está interesado en hacer esto.....6

21. Me siento frustrado/a gran parte del tiempo a causa de mi vista.  
(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Definitivamente cierto.....1  
 Mayormente cierto.....2  
 No está seguro/a.....3  
 Mayormente falso.....4  
 Definitivamente falso.....5

22. Tengo mucho menos control sobre lo que hago a causa de mi vista.  
(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Definitivamente cierto.....1  
 Mayormente cierto.....2  
 No está seguro/a.....3  
 Mayormente falso.....4  
 Definitivamente falso.....5

23. A causa de mi vista, tengo que depender demasiado de lo que otras personas me dicen.  
(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Definitivamente cierto.....1  
 Mayormente cierto.....2  
 No está seguro/a.....3  
 Mayormente falso.....4  
 Definitivamente falso.....5

24. Necesito mucha ayuda de los demás a causa de mi vista.  
(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Definitivamente cierto.....1  
 Mayormente cierto.....2  
 No está seguro/a.....3  
 Mayormente falso.....4  
 Definitivamente falso.....5

25. Me preocupa hacer cosas que puedan avergonzarme a mí o a los demás a causa de mi vista.  
(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Definitivamente cierto.....1  
 Mayormente cierto.....2  
 No está seguro/a.....3  
 Mayormente falso.....4  
 Definitivamente falso.....5

La entrevista ha terminado. Muchas gracias por su tiempo y ayuda.

**Apéndice de Preguntas opcionales adicionales (versión 2000)****SUBESCALA: SALUD GENERAL**

A1. ¿Cómo calificaría su salud en general, en una escala donde cero es tan malo como la muerte y el 10 es la mejor salud posible?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Peor										Mejor

**SUBESCALA: VISIÓN GENERAL**

A2. ¿Cómo calificaría su vista ahora (con gafas o lentes de contacto, si usted los usa), en una escala de 0 a 10, donde cero significa la peor visión posible como si estuviera ciego y 10 significa la mejor visión posible?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Peor										Mejor

**SUBESCALA: VISIÓN CERCANA**

A3. Cuando usa gafas, ¿qué dificultad tiene usted para la lectura de una guía telefónica, prospectos de medicamentos, o informes legales?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

Sin dificultad alguna.....	1
Un poco de dificultad .....	2
Dificultad moderada .....	3
Dificultad extrema .....	4
Dejó de hacer esto debido a su vista .....	5
Dejó de hacer esto para otras razones o no interesado en hacer esto.....	6

A4. A causa de su vista, ¿cuánta dificultad tiene usted en determinar si la cuenta en un restaurante, las facturas o los recibos que recibe están correctos?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

Sin dificultad alguna.....	1
Un poco de dificultad .....	2
Dificultad moderada .....	3
Dificultad extrema .....	4
Dejó de hacer esto debido a su vista .....	5

Dejó de hacer esto para otras razones o no interesado en hacer esto.....6

A3. A causa de su vista, ¿cuánta dificultad tiene usted en afeitarse, peinarse, o maquillarse?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Sin dificultad alguna.....1  
 Un poco de dificultad .....2  
 Dificultad moderada .....3  
 Dificultad extrema .....4  
 Dejó de hacer esto debido a su vista .....5  
 Dejó de hacer esto para otras razones o no interesado en hacer esto.....6

#### SUBESCALA: DISTANCIA DE LA VISIÓN

A6. A causa de su vista, ¿cuánta dificultad tiene usted para reconocer a las personas que entran en una habitación?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Sin dificultad alguna.....1  
 Un poco de dificultad .....2  
 Dificultad moderada .....3  
 Dificultad extrema .....4  
 Dejó de hacer esto debido a su vista .....5  
 Dejó de hacer esto para otras razones o no interesado en hacer esto.....6

A7. A causa de su vista, ¿qué dificultad tiene para practicar deportes activos u otras actividades al aire libre que usted le gustan (como el golf, bolos, correr o caminar)?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Sin dificultad alguna.....1  
 Un poco de dificultad .....2  
 Dificultad moderada .....3  
 Dificultad extrema .....4  
 Dejó de hacer esto debido a su vista .....5  
 Dejó de hacer esto para otras razones o no interesado en hacer esto.....6

A8. Debido a su vista, ¿qué dificultad tiene para ver y disfrutar de los programas de televisión?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Sin dificultad alguna.....1  
 Un poco de dificultad .....2  
 Dificultad moderada .....3  
 Dificultad extrema .....4  
 Dejó de hacer esto debido a su vista .....5  
 Dejó de hacer esto para otras razones o no interesado en hacer esto.....6

#### SUBESCALA: FUNCIÓN SOCIAL

A9. ¿Qué grado de dificultad o impedimento encuentra a causa de su vista, para invitar a amigos y familiares a su casa?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

- Sin dificultad alguna.....1  
 Un poco de dificultad .....2  
 Dificultad moderada .....3  
 Dificultad extrema .....4  
 Dejó de hacer esto debido a su vista .....5  
 Dejó de hacer esto para otras razones o no interesado en hacer esto.....6

#### SUBESCALA: CONDUCCIÓN

A10. [Este los artículos, "conducción en condiciones difíciles", se ha incluido como tema 16a como parte de la base de un conjunto de 25 elementos de VFQ25]

**SUBESCALA: LIMITACIONES DE ROL**

A11. Las siguientes preguntas son acerca de cosas que usted puede hacer por su visión. Para cada artículo, me gustaría que me dijera si esto es cierto todo el tiempo, la mayor parte del tiempo, parte del tiempo, una pequeña parte del tiempo o nunca.

A11a. ¿Recibe más ayuda de los demás a causa de su visión?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

Todo el tiempo.....1  
 La mayor parte del tiempo.....2  
 Parte del tiempo.....3  
 Una pequeña parte del tiempo.....4  
 Nunca.....5

A11b. ¿Está usted limitado en el tipo de cosas que usted puede hacer debido a su visión?

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

Todo el tiempo.....1  
 La mayor parte del tiempo.....2  
 Parte del tiempo.....3  
 Una pequeña parte del tiempo.....4  
 Nunca.....5

**SUBESCALAS: BIENESTAR / SOCORRO (A12) Y DEPENDENCIA (A13)**

Las siguientes preguntas son acerca de cómo usted se siente acerca de su visión. Para cada frase, por favor dígame si es definitivamente cierto, mayormente cierto, no está seguro, mayormente falso, definitivamente falso.

A12. Estoy a menudo irritable debido de mi vista

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

Definitivamente cierto.....1  
 Mayormente cierto.....2  
 No está seguro/a.....3  
 Mayormente falso.....4  
 Definitivamente falso.....5

A13. Yo no salgo de mi casa solo, a causa de mi vista

(Marque sólo una respuesta con un círculo)

Definitivamente cierto.....1  
 Mayormente cierto.....2  
 No está seguro/a.....3  
 Mayormente falso.....4  
 Definitivamente falso.....5

**Puntuación:**

$$\text{Media} = \frac{\text{anotar puntuación de cada pregunta \%}}{\text{número total de elementos, con respuestas que no falten}}$$

Item Numbers	Change original response category <sup>14</sup>	To recoded value of:
1,3,4,15 <sup>(b)</sup>	1	100
	2	75
	3	50
	4	25
	5	0
2	1	100 <sup>c</sup>
	2	80
	3	60
	4	40
	5	20
	6	0
5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,16,16a A3,A4,A5,A6,A7,A8,A9 <sup>(d)</sup>	1	100 <sup>c</sup>
	2	75
	3	50
	4	25
	5	0
	6	*
17,18,19,20,21,22,23,24,25, A11a,A11b,A12,A13	1	0
	2	25
	3	50
	4	75
	5	100
A1,A2	0	0
	60	10
	10	100



Field Test Version Ques.#	Sub-scale	Status	VFQ-25 Ques. #	Field Test Version Ques.#	Sub-scale	Status	VFQ-25 Ques. #
1	general health	S	1	29	social fx	---	---
2	general health	A	A1	30	social fx	A	A9
3	general vision	S	2	31	social fx	S	13
4	expectations	---	---	32	distance vision	A	A8
5	well-being/ distress	S	3	33	distance vision	A	A7
6	well-being/ distress	---	---	34	distance vision	S	14
7	ocular pain	S	19	35	driving (filter item)	S	15
8	expectations	---	---	35a	driving (filter item)	S	15a
9	expectations	---	---	35b	driving (filter item)	S	15b
10	expectations	---	---	35c	driving	S	15c
11	well-being/ distress	S	25	36	driving	---	---
12	ocular pain	S	4	37	driving	S	16
13	well-being/ distress	---	---	38	driving	S	16a *
14	general vision	A	A2	39a	role limitations	S	17
15	near vision	S	5	39b	role limitations	A	A11a
16	near vision	A	A3	39c	well-being/ distress	---	---
17	near vision	S	6	39d	role limitations	---	---
18	near vision	---	---	39e	role limitations	A	A11b
19	near vision	S	7	39f	role limitations	S	18
20	distance vision	S	8	40	well-being/ distress	A	A12
21	distance vision	---	---	41	dependency	S	20
22	distance vision	S	9	42	well-being/ distress	S	21
23	peripheral vision	S	10	43	well-being/ distress	S	22
24	distance vision	A	A6	44	dependency	---	---
25	social fx	S	11	45	dependency	A	A13
26	near vision	A	A4	46	dependency	S	23
27	color vision	S	12	47	dependency	S	24
28	near vision	A	A5				

\* VFQ-25 item 16a was listed in previous versions as part of the appendix of supplemental items (#A10).

Scale	Number of items	Items to be averaged (after recoding per Table 2)
General Health	2	1, A1
General Vision	2	2, A2
Ocular Pain	2	4, 19
Near Activities	6	5, 6, 7, A3, A4, A5
Distance Activities	6	8, 9, 14, A6, A7, A8
Vision Specific:		
Social Functioning	3	11, 13, A9
Mental Health	5	3, 21, 22, 25, A12
Role Difficulties	4	17, 18, A11a, A11b
Dependency	4	20, 23, 24, A13
Driving	3	15c, 16, 16a
Color Vision	1	12
Peripheral Vision	1	10